

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

**DER RADIOIMMUNOASSAY VON FIBRINOPEPTID A:
VERFAHRENSTECHNISCHE MODIFIKATIONEN
UND KLINISCHE ERPROBUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
MICHAEL SCHMID
aus
München
im Jahre 1981

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

DER RADIOIMMUNOASSAY VON FIBRINOPEPTID A:
VERFAHRENSTECHNISCHE MODIFIKATIONEN
UND KLINISCHE ERPROBUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

MICHAEL SCHMID

aus

München

im Jahre

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Marx

Dekan: Prof. Dr. med. H. Gastpar

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1981



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548324_0008

V o r w o r t

Die klinisch beobachtbaren Phänomene der Blutgerinnung und ihrer Störungen haben Ärzte und Forscher in allen Epochen der Menschheitsgeschichte beeindruckt. Aber erst im Jahre 1880, also vor ziemlich genau 100 Jahren, konnte A. Schmidt-Mülheim in Leipzig den ersten experimentell-wissenschaftlichen Zugang zu diesen bis dahin rationalem Verständnis entzogenen, humoral-biochemischen Vorgängen aufstoßen. Er beobachtete nach intravenöser Injektion von Peptonen bei Hunden, daß das Blut der Tiere die Gerinnungsfähigkeit verlor. Diese "neue und sicherlich sehr beachtenswerte Wirkung des Peptons" konnte Delezenne 1896 auf eine in der Leber enthaltene, durch Einwirkung von Peptonen freigesetzte Wirksubstanz zurückführen. Nun mußten freilich noch weitere zwanzig Jahre verstreichen, bevor der methodisch-wissenschaftliche Boden hinreichend fruchtbar geworden schien, um im Zuge einer regelrechten Wiederentdeckung der ungewöhnlichen Wirksubstanz aus der Leber in Amerika eine intensive Erforschung der biochemischen und physiologischen Zusammenhänge zu ermöglichen.

Als Jay McLean, damals Medizinstudent an der John-Hopkins-Universität in Baltimore, im Jahre 1916 die gerinnungshemmende Wirkung einer verunreinigenden Komponente der von ihm untersuchten Präparation von Thromboplastin aus Hundeleber entdeckte, waren ihm die europäischen Vorarbeiten nicht bekannt. Sein Lehrer, der Physiologe W. H. Howell, war so verblüfft, daß er dem jugendlich-begeisterten Forscher zunächst dringend anriet, seine Entdeckung in der Niederschrift seiner Untersuchungen über Thromboplastine zu verschweigen. Erst nach gründlicher experimenteller Überprüfung wagte es Howell schließlich im Jahre 1918, über diese bemerkenswerte Wirkung der von ihm dann mit Heparin bezeichneten Komponente des Leberextrakts öffentlich zu berichten. Damals drückte Howell

in einer Nebenbemerkung die vorsichtige Hoffnung aus, daß die neue Substanz möglicherweise nützliche Anwendung werde finden können in der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Gerinnungstendenz des strömenden Blutes einhergehen (nach einer Darstellung von Jorpes 1971).

Bis zur ersten klinischen Anwendung von Heparin durch Murray und Mitarbeiter im kanadischen Toronto sollten freilich noch fast zwei Jahrzehnte intensiver Forschungen über den physiologischen Ablauf der Blutgerinnung und ihre krankhaften Störungen vergehen, die in den Jahren 1934 bis 1936 in der Entwicklung zuverlässiger und aussagekräftiger Gerinnungstests durch A. J. Quick einen vorläufigen Höhepunkt erlebten. Die Hämostaseologie, die mit dem Heparin eine bald breit angewendete, hochwirksame Waffe in die Hand erhalten hatte, war damit endgültig in den Rang einer ernstzunehmenden, klinisch-biochemischen Spezialwissenschaft eingetreten.

Am Beispiel des Heparins läßt sich auch für die jüngere Zeit die wechselseitige Abhängigkeit von biochemischer Grundlagenforschung und klinischer Anwendung mühelos illustrieren: Im Jahre 1958 ergänzte R. Marx die bis dahin geübte systemische Heparinisierung durch die subkutane Regionaltherapie. Diese zunächst auf die Behandlung der tiefen Beinvenenthrombose zugeschnittene Applikationsform, von Marx selbst als "Blutegelbiß in Superform" karikiert, wurde bald auch auf die hochdosierte systemische Heparinisierung erweitert, und schließlich konnte v. Kaulla 1969 die subkutane Injektionsbehandlung mit Heparin als idealste Form der ambulanten Antikoagulation rühmen. Ihre deutlichen Vorzüge gegenüber der oralen Behandlung mit Cumarinderivaten belegte er mit den Ergebnissen subtiler Bestimmungen der Thrombinbildung und der Antithrombin-III-Aktivität in Plasmaproben sowie der bereits 1948 von Hartert entwickelten Thrombelastographie. In jüngster Zeit liefert die Anwendungs-

form der subkutanen Niedrigdosis-Heparinisierung, deren Wirksamkeit in der Prophylaxe postoperativer thrombo-embolischer Komplikationen 1972 im Rahmen einer internationalen, multizentrischen Studie überprüft wurde (Kakkar et al. 1972), erneut Impulse für die klinische Grundlagenforschung.

Was für die parenterale Heparintherapie ausgeführt wurde, gilt in gleicher Weise auch für die beiden anderen mächtigen Hauptsäulen, auf die sich unser pharmakologisches Arsenal in der Vorbeugung und Behandlung thrombotischer Erkrankungen heute stützen kann, die orale Antikoagulation mit Cumarinderivaten und die enzymatische Fibrinolyse. Stets muß man sich vor Augen halten, daß ein sinnvoller Einsatz dieser hochwirksamen Medikamente nur auf der Grundlage fundierter Kenntnisse über den komplexen molekularen Mechanismus der Hämostase sowie zuverlässiger Testmethoden über ihren aktuellen Funktionszustand möglich ist. In der Tat haben sich die Bemühungen der hämostaseologischen Grundlagenforschung in den vergangenen drei Jahrzehnten, unterstützt durch erheblich verfeinerte analytische Techniken, einerseits auf die detaillierte Aufklärung der molekularen Struktur und Funktion der an der Hämostase beteiligten plasmatischen Faktoren, andererseits auf die Entwicklung aussagekräftiger, sowohl globaler als auch phasen- und faktorenspezifischer biochemischer Testverfahren konzentriert.

In dieser Abhandlung soll über die in den Jahren 1976 und 1977 durchgeführten Arbeiten an der Weiterentwicklung und klinischen Erprobung eines im Jahre 1971 von Nossel und Mitarbeitern an der Columbia-Universität in New York entwickelten radioimmunologischen Nachweisverfahrens für Fibrinopeptid A, einem Folgeprodukt der Thrombinwirkung auf Fibrinogen, abschließend berichtet werden. Einige wichtige Ergebnisse, vor allem im Hinblick auf die mit Hilfe der Doppel-Antikörper-Methode erreichten Verbesserungen

des Testverfahrens, sind bereits 1977 veröffentlicht worden (Schramm et al. 1977). Die nachfolgende Darstellung gliedert sich in vier Hauptabschnitte:

Das erste Kapitel enthält eine Einführung in die Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase, soweit sie für das Verständnis der vorliegenden Arbeit dienlich ist, sowie eine Übersicht über spezifische biochemische Testverfahren, welche in den vergangenen Jahren geschaffen wurden mit dem Ziel, einen zuverlässigen Parameter für die aktuelle Thrombin-Aktivität im Blutplasma zu gewinnen. Es soll dem Leser eine Einordnung des hier beschriebenen Nachweisverfahrens für Fibrinopeptid A in den Bezug der gegenwärtigen Forschung ermöglichen und damit die Einschätzung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erleichtern.

Im zweiten Kapitel wird der Radioimmunoassay von Fibrinopeptid A in seiner ursprünglichen Form vorgestellt. Eigene Erfahrungen werden mitgeteilt, Problempunkte und Grenzen des Verfahrens aufgezeigt und eine Definition der Ziele für die eigenen Untersuchungen über methodische Verbesserungsmöglichkeiten vorgetragen.

Das dritte Kapitel enthält in gebotener Ausführlichkeit eine Beschreibung der Modifikationen, die wir für den Testablauf ausgearbeitet haben. Die erreichten Verbesserungen werden diskutiert und an den vorgegebenen Zielen gemessen.

Abschließend berichtet das vierte Kapitel über eine Reihe von klinischen Erfahrungen, die wir mit dem abgeänderten Test gewinnen konnten. Normalwerte für Plasmakonzentrationen sowie charakteristische Veränderungen des Plasmaspiegels bei verschiedenen Erkrankungen, die mit Hyperkoagulabilität des strömenden Blutes einhergehen, werden mitgeteilt.

Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. med. R. Marx für die freundliche Überlassung des Themas, die uneingeschränkte

Förderung der Arbeit sowie für wertvolle kritische Hinweise. Ferner ist es mir ein Anliegen, Herrn Dr. med. W. Schramm, der die Durchführung der experimentellen und klinischen Arbeit leitete, für die stets freundliche Aufgeschlossenheit, die er den Fragen des unerfahrenen Studenten entgegenbrachte, und für seine großzügige Unterstützung in Wort und Tat meine dankbare Verbundenheit auszusprechen. Auch Herrn Dr. med. F. W. Erhardt möchte ich herzlich danken für die mir zuteilgewordene Einführung in isotope-technisches Arbeiten sowie für die Ermöglichung der Ergebnisauswertung mit Hilfe des an der endokrinologischen Abteilung bestehenden Rechner-Programms.

An dieser Stelle ist es mir ein Bedürfnis, meinem hochgeachteten Vater und meiner geliebten Mutter meine tiefe Dankbarkeit zum Ausdruck zu bringen. Sie haben mir in vollkommen selbstverständlicher Hingabe die materielle Grundlage für das Studium der Medizin, den Traum meiner Jugend, und darüber hinaus unendlich viel mehr gegeben. Ihnen sei diese Schrift von Herzen zugedacht.

Inhaltsverzeichnis

I. Kapitel:

Einführung	1
----------------------	---

Abschnitt A:

Physiologie der Hämostase	1
-------------------------------------	---

1. Gesamtbetrachtung	1
2. Molekularstruktur von Fibrinogen	2
3. Thrombinwirkung und Fibrinopeptide	3
4. Plasmin und Fibrinogen-Spaltprodukte	6
5. Andere Proteasen	9

Abschnitt B:

Klinisch-biochemische Diagnostik	12
--	----

1. Klinische Aspekte	12
2. Lösliche Fibrin-Komplexe	14
3. Fibrinopeptid A	17

II. Kapitel:

Der Radioimmunoassay von Fibrinopeptid A	20
--	----

Abschnitt A:

Technik und eigene Erfahrungen	20
--	----

1. Gewinnung von Antiserum	20
2. Standard-FPA	21
3. Tyrosyl-FPA und Radiomarkierung	21
4. Blutentnahme und Verarbeitung	25
5. Äthanol-fällung	26
6. Dialyse	26
7. Der Radioimmunoassay	28
8. Auswertung	33

II. Kapitel (Fortsetzung):

Abschnitt B:

Diskussion und Fragestellungen	35
--	----

III. Kapitel:

Modifikationen	37
--------------------------	----

Abschnitt A:

Präzipitation durch zweiten Antikörper

("Doppel-Antikörper-Methode")	37
---	----

1. Prinzip	37
2. Titration des zweiten Antikörpers	38
3. Gesamttablauf	41
4. Inkubationszeiten	42
5. Rechner-gestützte Auswertung	43
6. Diskussion	44

Abschnitt B:

Ionenaustauscher-Verfahren	47
--------------------------------------	----

1. Prinzip	47
2. Dimensionierung	48
3. Bindungskinetik	51
4. Diskussion	53

IV. Kapitel:

Klinische Ergebnisse	55
--------------------------------	----

1. Vorbemerkungen	55
2. Normalwerte	55
3. FPA-Spiegel bei verschiedenen Erkrankungen .	57
4. Diskussion	58

Zusammenfassung	60
Literatur-Verzeichnis	61
Lebenslauf	68

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Beispiel einer Markierung von 2,5 µg Desamino- tyrosyl-FPA mit 0,5 mCi Jodid-125	24
Abb. 2: Titration des Anti-FPA-Kaninchenserums zur Ermittlung der optimalen Verdünnung	30
Abb. 3: Standardkurve	32
Abb. 4: Titrationskurve des zweiten Antikörpers	40
Abb. 5: Nachzeichnung der Standardkurve aus dem Rechner- Ausdruck der Auswertung einer RIA-Serie	45

I. Kapitel

E i n f ü h r u n g

Abschnitt A

Physiologie der Hämostase

1. Gesamtbetrachtung

Die lebenswichtige Funktion der Blutstillung ist durch ein komplexes Zusammenwirken vaskulärer, zellulärer und humoraler Mechanismen dreifach abgesichert. Dabei lehren uns die klinischen Erscheinungen bei den verschiedenen angeborenen und erworbenen Störungen der Blutstillung, daß jeder einzelnen Komponente des Gesamtsystems eine entscheidende Bedeutung zukommt. Dies tritt am deutlichsten bei der Betrachtung des hochkomplexen plasmatischen Gerinnungssystems zutage. Im strömenden Blut besteht ein außerordentlich fein abgestimmter Gleichgewichtszustand zwischen Aktivierung der Gerinnungsbildung und Wiederauflösung, der höchst empfindlich, rasch und flexibel sowohl auf allgemeine als auch lokale Störeinflüsse zu reagieren imstande ist.

Morawitz hat schon im Jahre 1904 den Grundaufbau des plasmatischen Gerinnungssystems richtig formuliert. In sein klassisches Schema, das bereits die drei Phasen der Thromboplastinentstehung, der Prothrombinaktivierung und der Fibrinbildung enthielt, konnten die in der Folgezeit nach und nach entdeckten Gerinnungsfaktoren des endogenen und exogenen Systems sinnvoll eingebaut werden und unsere Vorstellung vom Gesamtmechanismus vervollkommen.

Bei Verletzung der Gefäßwand, Blutstase oder Störungen der "Eukrinie" der Blutzusammensetzung entsteht als Resultante gerinnungsfördernder und -hemmender Einflüsse eine bestimmte

Thrombinaktivität, von deren Größe die Geschwindigkeit der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin proportional abhängig ist. Diese Tatsache macht die großen Bemühungen verständlich, die daran gesetzt worden sind, biochemische Testverfahren zu entwickeln, welche Rückschlüsse auf die in-vivo-Aktivität von Thrombin bei verschiedenen Krankheitszuständen sowie unter pharmakotherapeutischen Einwirkungen erlauben. Bevor ein Überblick über die bisher klinisch eingeführten Tests gegeben wird, sollen im folgenden kurz die molekularen Vorgänge bei der enzymatischen Umwandlung von Fibrinogen durch Thrombin und andere Proteasen dargestellt werden.

2. Molekularstruktur von Fibrinogen

Fibrinogen ist ein großes, gestrecktes, mäßig lösliches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von rund 340 000. Sein reichliches Vorkommen im Plasma - die Normalwerte bewegen sich um 300 mg/100 ml - ist Ausdruck seiner physiologischen Funktion als Strukturbaustein des hämostatischen Gerinnsels. Das Molekül setzt sich zusammen aus zwei identischen Untereinheiten, welche ihrerseits aus je drei Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 63 000 (A-alpha-Kette), 56 000 (B-beta-Kette) und 47 000 (gamma-Kette) aufgebaut sind. Zahlreiche Disulfidbrücken verknüpfen sowohl die Polypeptidketten untereinander als auch die beiden Untereinheiten miteinander zu einer kovalent verschweißten Großstruktur. (McKee et al. 1966, Blombäck und Blombäck 1972).

Das Molekül ist physiologisches Substrat für drei plasmatische Enzyme: 1. Thrombin, das die Umwandlung in polymerisationsfähiges Fibrin katalysiert; 2. Faktor XIII, der kovalente Quervernetzungen in das Fibringerinnsel einführt; 3. Plasmin, das sowohl Fibrinogen als auch Fibrin zu physiologisch nicht mehr verwendungsfähigen Bruchstücken, den sogenannten Fibrinogen-Spaltprodukten,

abbaut. Die Einwirkung der Proteasen Thrombin und Plasmin zieht die Freisetzung jeweils spezifischer proteolytischer Fragmente nach sich, deren quantitative Bestimmung demnach theoretisch einen Parameter für die in-vivo-Aktivität des des betreffenden Enzyms abgeben müßte. Faktor XIII ist eine Transamidase und bedarf, da ja spezifische Spaltprodukte fehlen, in diesem Zusammenhang keiner weiteren Erwähnung. Dagegen soll nun die Wirkung von Thrombin, Plasmin und einiger unphysiologischer bzw. unspezifischer Proteasen auf Fibrinogen ausführlicher besprochen werden.

3. Thrombinwirkung und Fibrinopeptide

Aktiviertes Thrombin ist eine zweikettige Serin-Protease mit Trypsin-ähnlicher Sekundärstruktur und Spezifität. Letztere Eigenschaft ist jedoch gegenüber dem Pankreas-Enzym auf bestimmte Regionen am N-terminalen Pol der A-alpha- und B-beta-Ketten des Fibrinogen-Moleküls eingengt.

Als erster, rasch erfolgender Schritt der Thrombinwirkung wird das kurzkettige Fibrinopeptid A vom N-Terminus der A-alpha-Ketten abgespalten. Blombäck und Blombäck (1972) haben die Vermutung geäußert, daß dies zu einer Konformationsänderung des Fibrinogenmoleküls führt, ein Vorgang, der nicht nur die End-zu-End-Anlagerung von Fibrinmolekülen gestattet, sondern nun auch den N-Terminus der B-beta-Ketten der Thrombinwirkung aussetzt. Die wesentlich langsamer vorstattengehende Abspaltung von Fibrinopeptid B wird gefolgt von einer Seit-zu-Seit-Anlagerung der nunmehr in vollem Ausmaß polymerisationsfähigen Fibrinmoleküle. Wie angesichts des symmetrisch-dimeren Aufbaus des Fibrinogen-Moleküls nicht anders zu erwarten, entstehen bei seiner vollständigen Umwandlung in Fibrin pro mol je zwei mol Fibrinopeptide A und B. Unter physiologischen Bedingungen mag freilich die Abspaltung von Fibrinopeptid B entbehrlich sein.

Die Freisetzung stickstoffhaltiger Fragmente ohne Protein-Eigenschaften aus Fibrinogen durch Thrombin wurde zuerst durch Lorand im Jahre 1951 papierchromatographisch nachgewiesen, auf den auch die Benennung "Fibrinopeptide" zurückgeht. Bettelheim und Bailey (1952) konnten dann mittels Papier-Elektrophorese in Azetat-Puffer bei einem pH von 4,15 zwei mit verschiedener Geschwindigkeit anionisch wandernde Fraktionen isolieren. Sie bezeichneten die schneller wandernde Bande als Fibrinopeptid A, die langsamere als Fibrinopeptid B, und stellten auch die ersten Analysen der am Aufbau ihrer Primärstruktur beteiligten Aminosäuren an.

Beide Fibrinopeptide sind kurzkettinge, stark saure Moleküle mit vergleichbaren Molekulargewichten (Fibrinopeptid A: 1536, Fibrinopeptid B: 1552, Angaben nach Blombäck et al. 1966). Die Beobachtung, daß Fibrinopeptid A durch Thrombin viel rascher und vollständiger freigesetzt wird als Fibrinopeptid B, wurde zuerst von Bettelheim (1956) an Rinder-Fibrinogen mittels qualitativer papierelektrophoretischer Analysen gemacht. Blombäck und Vestermark (1958) bestätigten diesen Sachverhalt auch quantitativ, indem sie die in einem gerinnenden Fibrinogen-Thrombin-System entstehenden Fibrinopeptide in regelmäßigen zeitlichen Intervallen aus dem Überstand isolierten und mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie quantifizierten. Sie konnten weiterhin zeigen, daß zwischen der Menge an gebildetem Fibrin und der Menge von freigesetztem Fibrinopeptid A eine lineare Beziehung bestand. Diese wichtigen Ergebnisse konnten später durch Abildgaard (1965) auch für menschliches Fibrinogen und Thrombin bestätigt werden.

Die Kinetik der Reaktion zwischen Fibrinogen und Thrombin ist erster Ordnung, solange physiologische Fibrinogen-Konzentrationen nicht wesentlich überschritten werden. Dieses Reaktionsverhalten ist am Erscheinen von N-terminalem Glycin im System (Blombäck 1958 und 1967) und an der Freisetzung von Fibrinopeptid A (Bilezikian et al. 1975) ablesbar.

Mehrere Arbeitsgruppen haben eine Bestimmung der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit bei Substratsättigung, $V_{\max}$, sowie der Michaelis-Konstante, K_m , sowohl im bovinen (Bando et al. 1972) als auch im menschlichen Fibrinogen-Thrombin-System (Hogg und Blombäck 1974, Nossel et al. 1976) versucht. Nossel und Mitarbeiter (1976), die das sehr empfindliche radioimmunologische Nachweisverfahren für FPA verwendeten, geben für das menschliche System eine $V_{\max}$ von 0,8 nmol/sec/U Thrombin und eine K_m von etwa 3 $\mu\text{mol/l}$ an. Letzterer Wert entspricht laut Definition der Michaelis-Konstanten derjenigen Fibrinogen-Konzentration, bei der die halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit, hier also 0,4 nmol/sec/U Thrombin, erreicht wird. Demgegenüber liegt die normale Plasma-Konzentration von Fibrinogen unter Berücksichtigung eines Molekulargewichts von 340 000 g/mol bei etwa 10 $\mu\text{mol/l}$. Hieraus ergibt sich die interessante Feststellung, daß in vivo aktiviertes Thrombin unter physiologischen Bedingungen zwar in der Nähe der Substratsättigung arbeitet, daß aber andererseits Änderungen der Fibrinogenkonzentration sich noch deutlich der Reaktionsgeschwindigkeit mitteilen müssen, und zwar umso näher proportional, je weiter der Fibrinogen-Spiegel unter die Norm abfällt. Dies könnte die klinische Beobachtung erklären, daß eine Hypofibrinogenämie deutlicheren Ausmaßes relativ schnell zu Störungen der Blutgerinnung im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie führt.

Die Hauptfunktion der Fibrinopeptide besteht offenbar darin, bestimmte Polymerisations-aktive Zentren innerhalb des N-terminalen Disulfidknotens des Fibrinogen-Moleküls zu maskieren. Dem Fibrinopeptid B werden darüber hinaus noch unterschiedliche andere Funktionen unterlegt wie eine Potenzierung der auf glatte Muskulatur kontraktionsfördernden Wirkung von Bradykinin (Osbahr et al 1964, Blombäck et al 1969), eine vasokonstriktorische Wirkung durch direkten Angriff an glatten Muskelzellen der Gefäßwand (Bayley et al. 1967, Colman et al. 1967, Osbahr 1975,

Osbahr und Custodio 1975) und eine chemotaktische Aktivität auf Neutrophile und Monozyten (Kay et al. 1974). Die Beobachtung, daß zirkulierende Fibrinopeptide in der Lage sein sollen, die Neusynthese von Fibrinogen in der Leber zu stimulieren (Kropatkin und Izak 1968), konnte nicht bestätigt werden (Ittyerah et al. 1972).

Es sei angemerkt, daß menschliches Fibrinopeptid A bei einer Minderheit der Population in zwei Strukturvarianten vorkommt: Fehlen des N-terminalen Alanins kennzeichnet das "Fibrinopeptid AY", ein phosphorylierter Serinrest findet sich beim "Fibrinopeptid AP" (Blombäck et al. 1966).

4. Plasmin und Fibrinogen-Spaltprodukte

In Analogie zur Stellung des Thrombins am "Schleusentor" der Gerinnungskaskade integriert Plasmin in seiner Aktivität die fördernden und hemmenden Einflüsse des fibrinolytischen Systems und fungiert gewissermaßen als sein "Exekutivorgan", indem es sowohl Fibrinogen als auch monomeres und polymeres Fibrin angreift und zu unbrauchbaren Spaltprodukten abbaut.

Die Wirkung des Plasmins auf Fibrinogen muß im Rahmen dieser Einführung insoweit dargestellt werden, als die N-terminalen Plasmin-induzierten Fragmente des Fibrinogens Fibrinopeptid A enthalten können. Dies wird dann der Fall sein, wenn die betreffenden Fragmente von intaktem Fibrinogen herrühren, das der Einwirkung von Thrombin entgangen ist. Es läßt sich leicht vorstellen, daß solche Fragmente in immunologischen Nachweisverfahren für Fibrinopeptid A mit dem verwendeten Antikörper kreuzreagieren und solchermäßen zu falsch hohen Meßwerten führen können. Wie später im einzelnen ausgeführt werden wird, stellen diese Fibrinopeptid-A-enthaltenden, Plasmin-induzierten Fibrinogen-Spaltprodukte in der Tat ein bisher noch nicht in befriedigender Weise gelöstes Problem für die Spezifität des Radioimmunoassays von Fibrinopeptid A dar.

Die meisten Autoren sind sich dahingehend einig, daß die Proteolyse von Fibrinogen durch Plasmin in einer mehr oder weniger geordneten Reihenfolge abläuft. Der erste Schritt, mit dem die "Frühphase" eingeleitet wird, besteht in der Abspaltung verhältnismäßig großer, einkettiger Fragmente vom C-terminalen Pol der alpha-Ketten mit Molekulargewichten von rund 20 000 bzw. 50 000. Der zurückbleibende Fibrinogen-Restkörper ist noch voll gerinnungsfähig, ebenso wie das nach Abspaltung kleiner einkettiger Peptidbruchstücke vom N-terminalen Pol der B-beta-Ketten als Fragment X bezeichnete Folgeprodukt. Die Gerinnungsfähigkeit geht erst in der sogenannten "Spätphase" der Plasminwirkung verloren, in deren Ablauf das dimer-symmetrische Fragment X an jeweils korrespondierenden Stellen im mittleren Abschnitt jeder Untereinheit durch Auftrennung aller drei Ketten in drei großmolekulare, jeweils wiederum dreikettige, in sich durch Disulfidbrücken zusammengehaltene Bruchstücke aufgespalten wird. Das zentrale, dimer-symmetrische Bruchstück heißt Fragment E, während die unsymmetrischen, identischen Bruchstücke der beiden Seitenarme als Fragmente D bezeichnet werden. Ein durch Abspaltung nur eines der beiden Fragmente D aus Fragment X entstehendes, unsymmetrisches Zwischenprodukt, Fragment Y, ist ebenfalls bereits gerinnungsunfähig. Diese Darstellung gründet auf dem sequentiellen Schema der Plasminwirkung, wie es von Pizzo und Mitarbeitern (1972) vorgeschlagen wurde.

Selbstverständlich greift Plasmin, wie bereits angedeutet, auch Fibrin-Monomere, lösliche großmolekulare Fibrin-komplexe und geronnenes Fibrin an, ja dies muß sogar als seine eigentliche Aufgabe angesehen werden. Die dabei entstehenden Bruchstücke werden nach den obigen Erläuterungen teils den erwähnten früh- und spätphasigen Fragmentfamilien zuzuordnen, teils unregelmäßig gestaltet sein. Sie bedürfen jedoch im Rahmen dieser Einführung keiner weiteren Besprechung, da sie ja, als Merkmal einer

stattgehabten Thrombineinwirkung des Fibrinopeptid A entbehren und somit keine Störquellen in immunologischen Nachweisverfahren dieses Peptids darstellen können.

Betrachten wir das Endresultat der Einwirkung von Plasmin auf Fibrinogen, so liegen als Endprodukte einerseits verhältnismäßig kompakte, gegenüber weitergehender Proteolyse resistente, großmolekulare Kernprodukte, die Fragmente D, E und Y vor, andererseits entstehen eine Reihe von kleineren einkettigen Bruchstücken, darunter auch ein Fibrinopeptid-B-enthaltender Abschnitt des N-terminalen Pols der B-beta-Kette, welche sehr rasch aus der Zirkulation verschwinden. Fibrinopeptid A bleibt hingegen bis zuletzt im Molekülverband des N-terminalen Disulfidknotens erhalten, wo es unverändert den N-terminalen Pol der alpha-Kette bildet. Die Fragmente E und Y sind somit in der Lage, soweit sie keine Alteration durch Einwirkung von Thrombin erfahren haben, den immunologischen Nachweis von Fibrinopeptid A durch Kreuzreaktion mit dem dort verwendeten Antikörper zu verfälschen. Demgegenüber können die Fibrinogen-ähnlichen, gerinnungsfähigen Zwischenprodukte der Plasmin-Frühphase zusammen mit dem Fibrinogen selbst durch relativ einfache Fällungsmethoden aus den Plasma-proben entfernt werden.

Erwähnung verdient noch die Tatsache, daß die frühphasigen, gerinnungsfähigen Fibrinogen-Spaltprodukte, nicht aber die Fragmente D, E und Y, in lösliche Fibrinkomplexe eingebaut und in entsprechenden Testverfahren für diese hochmolekularen Komplexe mitgemessen werden, was wiederum die Spezifität der Testaussage in Frage stellt. (Smith und Bang 1972, Latallo et al. 1976). Alle Plasmin-induzierten, hochmolekularen Spaltprodukte üben darüber hinaus eine gerinnungshemmende Wirkung aus, indem sie sich an Fibrinkomplexe anlagern und den regelrechten Polymerisationsvorgang durch Kettenabbruch verunmöglichen.

5. Andere Proteasen

Die unspezifische pankreatische Serin-Protease Trypsin ist in der Lage, beide Fibrinopeptide sowie auch andere Fragmente der A-alpha- und B-beta-Ketten von Fibrinogen abzuspalten (Wallén 1971). Genauere Untersuchungen zur Kinetik durch Bilezikian und Mitarbeiter (1975) erbrachten den Nachweis, daß dabei Fibrinopeptid B rascher freigesetzt wird als Fibrinopeptid A.

Wie schon erwähnt, weisen die Pankreas-Proteasen und aktiviertes Thrombin große Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Struktur und Spezifität auf, ein interessanter Sachverhalt, der wohl durch die enge phylogenetische Verwandtschaft der genannten Enzyme erklärt werden kann. Nicht zuletzt diese Tatsache könnte den in erster Linie durch klinische Beobachtungen nahegelegten Verdacht erhärten, daß pankreatische Proteasen in der Pathogenese der bei schweren Verlaufsformen einer akuten Pankreatitis nahezu obligaten Schock-Symptomatik mit disseminierter intravaskulärer Gerinnung möglicherweise die Hauptrolle spielen. Freilich sind über diese Frage die Akten der Forschung noch keineswegs geschlossen. Es sei in diesem Zusammenhang lediglich nochmals auf die von mehreren Untersuchern behauptete vasokonstriktorische Wirkung von Fibrinopeptid B hingewiesen, die Bayley und Mitarbeiter (1967) vor allem auch im Lungenkreislauf nachgewiesen haben wollen. Folgt man diesen Hinweisen, so könnte Fibrinopeptid B einer wichtigen Vermittlerrolle zwischen zirkulierender Trypsin-Aktivität und Anstoß eines Schock-Geschehens verdächtig werden.

Aus Granulozyten konnten eine Reihe von neutralen Proteasen isoliert werden, die in der Lage sind, Fibrinogen und Fibrin unter physiologischen Bedingungen zu spalten. Plow und Edington (1975) wiesen nach, daß die dabei entstehenden

Fragmente, ähnlich wie die frühphasigen Plasmin-induzierten Spaltprodukte, den Gerinnungsablauf durch Interferenz mit der Fibrinpolymerisation stören können. ,

Durch diese Leukozyten-Proteasen werden nach Untersuchungen von Bilezikian und Nossel (1977) zwar die Fibrinopeptide selbst nicht abgespalten, wohl aber größere, noch dialysierbare Fragmente, die diese Peptide enthalten. Somit können auch Leukozytenfermente einen Unsicherheitsfaktor bezüglich der Spezifität immunologischer Nachweisverfahren für Fibrinopeptid A abgeben.

Ob Leukozyten-Proteasen eine biologische Bedeutung innerhalb der Fibrinolyse zukommt, ist nicht hinreichend geklärt. Diskutiert wird vor allem eine Funktion im normalen Katabolismus von Fibrinogen und Fibrin.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde von Egbring und Mitarbeitern (1977) bei Patienten mit akuter Leukämie bzw. mit septischen Erkrankungen. Sie konnten in beiden Patientenkollektiven eine zirkulierende Leukozyten-Elastase, komplexgebunden an alpha-1-Antitrypsin, nachweisen. Bei den Elastase-positiven Patienten waren stets auch die Fibrinogen-Spaltprodukte im Plasma pathologisch erhöht. Freilich ist eine eindeutige Zuordnung der Hyperfibrinolyse zu bestimmten Proteasen hier erschwert durch die Tatsache, daß bei den genannten Krankheitsbildern meist auch die Plasmin-vermittelte Fibrinolyse aktiviert sein dürfte.

Der Vollständigkeit halber sollen hier noch in gewissen Schlangengiften enthaltene Proteasen angeführt werden, die mancherorts zur "therapeutischen Defibrinierung" bei thrombotischen Erkrankungen erprobt worden sind. Ihr wirksames Prinzip besteht darin, Fibrinogen in jeweils charakteristischen Mustern zu spalten und dadurch ungerinnbar zu machen. Es liegen Untersuchungen zur fibrinolytischen

Wirkung von Arvin, einer Präparation aus dem Gift der Malayen-Mokassinschlange (*Ankistrodon rhodostoma*, Ewart et al. 1967), Reptilase, auch Defibrase genannt, der wirksamen Komponente des Gifts der Gewöhnlichen Lanzenotter (*Bothrops atrox*, Blombäck und Yamashina 1958, Asbeck et al. 1974, Bilezikian et al. 1975) sowie einer Fraktion aus dem Gift der Südlichen Kupferkopf-Grubenotter (*Ankistrodon contortrix contortrix*, Herzig et al. 1970, Bilezikian et al. 1975) vor. Dabei verdient vor allem die unterschiedliche Kinetik der Abspaltung von Fibrinopeptid A und B Beachtung.

Abschnitt B

Klinisch-biochemische Diagnostik

1. Klinische Aspekte

Die große Herausforderung der hämostaseologischen Labor-diagnostik hat ihren Urheber im mannigfaltigen Formenkreis der Hyperkoagulabilität. In der weitgefaßten Auslegung dieses Begriffes sind alle krankhaften Zustände enthalten, die mit einer akut oder chronisch gesteigerten Gerinnungsaktivität des strömenden Blutes einhergehen. Nimmt man eine Einteilung in lokalisierte Prozesse auf der einen, in generalisierte Ausprägungen auf der anderen Seite vor, so sind hierdurch die großen Syndromgruppen der Thrombose und der disseminierten intravaskulären Gerinnung gekennzeichnet.

Bei der tiefen Phlebothrombose, der häufigsten klinisch relevanten Form einer lokalisierten Hyperkoagulabilität, findet im anatomisch-funktionell veränderten Venenbett der unteren Extremitäten ein durch die chronische Blutstase vermittelter, schleichend-progredienter Prozeß der intravasalen Gerinnselformung, der reaktiven Fibrinolyse und der bindegewebigen Organisation statt. Dabei ist zwar der Umsatz von Gerinnungsfaktoren chronisch gesteigert, erreicht aber praktisch nie ein solches Ausmaß, daß ein meßbarer Verbrauchszustand in Erscheinung träte. Dagegen wird der Patient in erster Linie durch rezidivierende Lungenembolien gefährdet. Die definitive Diagnose einer tiefen Venenthrombose beruht auf der Phlebographie. Einen bedeutenden Fortschritt in Richtung Früherfassung sich bildender Venenthromben erbrachte die Szintigraphie mit ¹²⁵J-Fibrinogen. Die Aufwendigkeit der genannten Verfahren läßt es bei der außerordentlich großen Häufigkeit der Erkrankung wünschenswert erscheinen, einen einfach zu bestimmenden biochemischen Parameter in der

Hand zu haben, mit dessen Hilfe sich ein klinischer Verdacht auf eine Phlebothrombose im Frühstadium bestätigen ließe.

Das Syndrom der disseminierten intravaskulären Gerinnung, im angloamerikanischen Sprachgebrauch kurz als "DIC syndrome" (DIC für "disseminated intravascular coagulation") bezeichnet, ist durch die generalisierte Ausprägung und einen meßbaren Verbrauch von Gerinnungsfaktoren gekennzeichnet. Seine Ätiologie ist sehr unterschiedlich: jeweils typische auslösende Erkrankungen sind die Gram-negative Sepsis für die akute Verlaufsform, Leukämien und andere Tumoren für das chronische Erscheinungsbild. Klinisch imponieren einerseits thrombotische und thromboembolische Komplikationen wie Phlebothrombosen und Thrombophlebitis migrans, arterielle und Lungenembolien, andererseits können lebensbedrohliche und kaum beherrschbare Blutungen in allen Organen auftreten, die durch den Verbrauchszustand von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten bedingt sind. Wenn auch die Diagnose einer fortgeschrittenen Verbrauchs-koagulopathie aus dem klinischen Bild wie auch aus dem Nachweis einer verringerten Fibrinogenkonzentration, eines erhöhten Plasmaspiegels von Fibrinogenspaltprodukten, einer Verlängerung der Thrombinzeit, einer Thrombozytopenie sowie eines abgeflachten und verzögerten Kurvenanstiegs im Thrombelastogramm nicht schwer ist, so ist es zu diesem Zeitpunkt für den Einsatz wirksamer Gegenmaßnahmen oft schon zu spät. So wird verständlich, daß das Bestreben um eine Frühdiagnose der disseminierten intravaskulären Gerinnung vor Einsetzen deutlicher Verbraucherscheinungen die hämostaseologische Grundlagenforschung dahingehend stimuliert hat, spezifische Tests für die aktuelle Gerinnungsaktivität des Blutplasmas zu entwickeln. Dabei hat sich gezeigt, daß die Unterscheidung zwischen Frühstadien eines DIC-Syndroms und primärer Hyperfibrinolyse, letzterer ein zumeist harmloser Befund, nicht immer eindeutig gelingt. Die Brauchbarkeit von Tests zur

Frühdiagnose des DIC-Syndroms wird daher einerseits am Merkmal der Spezifität, andererseits natürlich auch an der erreichbaren Empfindlichkeit gemessen werden müssen.

Allen Zuständen der Hyperkoagulabilität ist eine Erhöhung der Thrombin-Aktivität gemeinsam, eine theoretische Forderung die sich zwanglos aus der Stellung des Thrombins als Katalysator der Endstrecke des Gerinnungssystems ergibt. Für die Bestimmung der Thrombin-Aktivität in Plasmaproben bieten sich theoretisch zwei Ansätze an: 1. direkte Messung der enzymatischen Aktivität mit den Methoden der konventionellen Enzymdiagnostik; 2. Messung der Konzentration von Produkten der Thrombinwirkung. Der erstgenannte Weg erscheint schwer gangbar, da ein absolut Thrombin-spezifisches Substrat, das in einem derartigen Test einzusetzen wäre, nicht existiert. So haben Svendsen und Mitarbeiter (1972) ein partiell dem Fibrinopeptid A analoges Oligopeptid synthetisiert, das eine P-Nitroanilid-Gruppe in Ankoppelung an das C-terminale Arginin trug und als chromogenes Substrat von mehreren Enzymen, unter ihnen Thrombin und Trypsin, umgesetzt wurde. Demgegenüber ist die Bestimmung Thrombin-induzierter Fibrinogen-Derivate in zahlreichen Varianten ausgearbeitet worden, wobei man große Hoffnungen sowohl auf den Nachweis löslicher Fibrin-Komplexe als auch auf die Messung von Fibrinopeptid-A-Konzentrationen im Blutplasma gesetzt hat. Beide Verfahrensansätze sollen nun ausführlicher besprochen werden.

2. Lösliche Fibrin-Komplexe

Shainoff und Mitarbeiter (Shainoff und Page 1962, Sasaki et al. 1966) wiesen nach, daß Fibrin in der Lage ist, mit Fibrinogen stabile, lösliche Komplexe zu bilden, die in der Kälte präzipitieren ("Kryofibrin"). Die Löslichkeit bleibt so lange erhalten, wie ein Verhältnis

der Konzentrationen zwischen Fibrin und Fibrinogen von 1:5 nicht überschritten wird. In ihrer Erklärung dieses Phänomens gehen Blombäck und Mitarbeiter (1976) von der Vorstellung aus, daß Fibrinogen je zwei polymerisationsaktive Zentren in der N-terminalen E-Region sowie in den C-terminalen D-Regionen trägt. Durch Abspaltung von Fibrinopeptid A werden die Zentren der E-Region demaskiert, so daß das entstehende Fibrin-Monomer mit den aktiven Zentren der D-Regionen zweier weiterer Fibrin-Moleküle, aber ebenso auch zweier Fibrinogen-Moleküle, eine sterische Affinitätsbindung eingehen kann. Ist Fibrinogen in reichlichem Überschuß vorhanden, so kommt es stets zum baldigen Kettenabbruch durch Absättigung aktivierter Polymerisationszentren der E-Region mit Fibrinogen, so daß lösliche Fibrin-Fibrinogen-Komplexe unterschiedlicher Größe entstehen. Überschreitet dagegen die Fibrinbildung eine bestimmte Schwelle, so entstehen sprunghaft die ersten längeren Fibrinfäden und leiten die Ausfällung eines Gerinnsels ein. In Erweiterung dieser Hypothese läßt sich postulieren, daß auch Plasmin-induzierte Fragmente von Fibrinogen, soweit sie intakte D-Regionen tragen, in der Lage sein müßten, mit Fibrin lösliche Komplexe zu bilden unter gleichzeitiger Hemmung der Polymerisation. In der Tat haben Smith und Bang (1972) sowie Latallo und Mitarbeiter (1976) feststellen können, daß die frühphasigen, gerinnungsfähigen Fibrinogen-Spaltprodukte einschließlich Fragment X, nicht aber die Fragmente Y, D und E, in lösliche Fibrin-komplexe inkorporiert werden.

Lösliche Fibrinkomplexe können durch Hinzufügen von Äthanol oder Protaminsulfat in kleinem Mengenverhältnis differentiell ausgefällt werden. Dieses im angloamerikanischen Schrifttum mit der Bezeichnung "Parakoagulation" versehene Phänomen wurde von einer Reihe von Untersuchern dazu verwendet, zirkulierende Fibrinkomplexe in Plasmaproben nachzuweisen. Der Äthanol-Fällungstest wurde von Godal und Abildgaard (1966) entwickelt und durch Breen und Tullis (1968, 1969) verbessert. Der Protamin-Fällungstest

wurde zuerst von Lipinski und Worowski (1968) angegeben. Umfangreiche Untersuchungen haben ergeben, daß Variablen wie Inkubationszeit, Temperatur, Fibrinogenkonzentration sowie das bei der Blutentnahme verwendete Antikoagulans und die Handelsmarke des verwendeten Protaminsulfats großen Einfluß auf Empfindlichkeit und Spezifität der Fällungsteste haben. Yudelmann und Mitarbeiter (1974) haben Äthanol und Protaminsulfat hinsichtlich ihres differentiellen Fällungsverhaltens auf Fibrinogen und Fibrin untersucht und dem Protaminsulfat die deutlich höhere Trennschärfe zugesprochen. Mit dem Protaminsulfat-Fällungstest sollen 0,02 - 0,05 mg/ml löslicher Fibrin-Fibrinogen-Komplexe und 5 - 10 mg/ml frühphasiger Fibrinogen-Spaltprodukte nachweisbar sein (Kidder et al. 1972, Niewarowski und Gurewich 1971).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die differentiellen Fällungsteste mit Äthanol und Protaminsulfat im Rahmen der Frühdiagnose einer Hyperkoagulabilität eine qualitative, schnell und einfach zu erhaltende Testaussage mit begrenzter Spezifität und Empfindlichkeit liefern. Daß das Testergebnis im Zweifelsfall lediglich unterstützenden und keinesfalls beweisenden Charakter hat, zeigen Untersuchungen von Palester-Chlebowczyk und Mitarbeitern (1971) sowie von Kidder und Mitarbeitern (1972), die falsch positive Protaminfällungsreaktionen bei einigen Patienten ohne klinische und laborchemische Anzeichen für ein DIC-Syndrom mitgeteilt haben. Andererseits sind falsch negative Ergebnisse offenbar nicht beobachtet worden.

Lösliche Fibrin-Fibrinogen-Komplexe können dank ihres hohen Molekulargewichts gelchromatographisch fraktioniert und quantifiziert werden. Mehrere Arbeitsgruppen (Fletcher et al. 1970, Graeff et al. 1972) haben entsprechende Verfahren angegeben und klinisch erprobt. Freilich wurde eine breite klinische Anwendung der Molekularsieb-Chromatographie bisher wegen ihrer großen Aufwendigkeit und

mangelnden Spezifität verhindert. Größere Beachtung hat auch ein affinitätschromatographisches Verfahren gefunden, bei dem lösliche Fibrinkomplexe an Fibrinogen-beladene Sepharose-Säulen adsorbiert und im anschließenden Eluat quantitativ nachgewiesen werden (Matthias et al. 1973 und 1977). Yudelman und Mitarbeiter (1974) geben an, daß dieses Verfahren eine schärfere Trennung zwischen Fibrinogen und Fibrin leistet als der Protaminsulfat- oder Äthanol-fällungstest. Freilich ist es wenig wahrscheinlich, daß diese an sich elegante Methode in der Lage ist, zwischen Fibrinkomplexen und Plasmin-induzierten Spaltprodukten zu differenzieren.

3. Fibrinopeptid A

Seit Nossel und Mitarbeiter (1971, 1974) einen Radioimmunoassay für Fibrinopeptid A vorgestellt haben, steht ein hochempfindliches Meßverfahren für Plasmakonzentrationen dieses spezifischen Produkts der Thrombin-Aktivität zur Verfügung. Mehrere Arbeitsgruppen haben Modifikationen und Verbesserungen vorgeschlagen (Gerrits et al. 1974, Budzynski und Marder 1975, Hofmann und Straub 1977). Das Prinzip des Verfahrens bleibt unverändert und wird durch die Technik des Radioimmunoassays strukturiert: Antiserum gegen Fibrinopeptid A wird durch Immunisierung von Kaninchen mit dem nativen oder synthetischen Peptid erhalten, wobei das relativ kleine Molekül, welches selbst nur Hapten-Eigenschaften hat, zur Erzeugung von Immunität an Albumin gekoppelt werden muß. Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Vergleichssubstanz ("Tracer") wird ein Tyrosyl-Analoges von Fibrinopeptid A mit Jod-125 am aromatischen Tyrosin-Ring jodiniert. Im eigentlichen Assay konkurrieren im Ansatz das Prüf-Antigen unbekannter Konzentration mit dem in konstanter Menge zugesetzten Vergleichs-Antigen, der radioaktiv markierten "Spürsubstanz", um die Bindung am Antikörper. Natives Fibrino-

peptid A wird das markierte Analoge umso weitgehender vom Antikörper verdrängen können, je höher seine Konzentration im Testansatz ist. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts wird der Antigen-besetzte Antikörper vom freien Antigen durch Präzipitation abgetrennt. Die nunmehr mit dem Präzipitat assoziierte Radioaktivität stellt ein eichfähiges Maß für die Menge an nativem Fibrinopeptid A dar, die im Ansatz vorhanden gewesen war.

Die Bestimmung von Fibrinopeptid-A-Plasmaspiegeln stellt theoretisch den zuverlässigsten Parameter für die aktuelle Thrombinaktivität dar, wie aus den Spezifitätsmerkmalen der Fibrinogen-spaltenden Enzyme ersehen werden kann (siehe Abschnitt A dieses Kapitels). Die Aktualität der jeweils gemessenen Plasmaspiegel wird durch die Tatsache unterstrichen, daß die Halbwertszeit für das Verschwinden von menschlichem Fibrinopeptid A aus dem Kreislauf nur etwa 3 Minuten beträgt, was auf eine rasche Elimination in einem spezifischen Organ schließen läßt (Nossel et al. 1974). Dabei muß offenbar das retikuloendotheliale System maßgeblich beteiligt sein, da eine renale Ausscheidung in nennenswertem Umfang nicht nachgewiesen werden konnte (Shainoff und Page 1960, Teger-Nilsson und Blombäck 1967, Nossel 1976).

Besondere Aufmerksamkeit verdient wiederum die Frage nach der Spezifität radioimmunologischer Bestimmungen von Fibrinopeptid A. Wie bereits in Abschnitt A ausgeführt, können gewisse Plasmin-induzierte Fibrinogen-Spaltprodukte mit dem Antikörper gegen Fibrinopeptid A kreuzreagieren und falsch hohe Meßwerte verursachen. Die Verarbeitung der Plasmaproben in der Form, wie sie von den Originalbeschreibern des Assays durchgeführt wurde (Nossel et al. 1971 und 1974), schließt nicht aus, daß kleinmolekulare, dialysierbare Fibrinogen-Spaltprodukte, vor allem die Fragmente E und Y, in den Testansatz gelangen und das Ergebnis der Bestimmung verfälschen. Einen Ansatzpunkt

zur Lösung dieses Problems haben Nossel und Mitarbeiter selbst ausgearbeitet (Canfield et al. 1976, Nossel et al. 1976): sie untersuchten die differentielle Immunoreaktivität von 14 verschiedenen Kaninchen-Antiseren gegen Fibrinopeptid A im Vergleich mit Fibrinogen und Fibrinopeptid-A-enthaltenden Spaltprodukten. Nach Maßgabe ihrer hierbei offenbarten Spezifität konnten diese Antiseren in drei Gruppen klassifiziert werden. Die "besten" Antiseren erreichten eine differentielle Spezifität gegenüber Fibrinogen-Spaltprodukten von etwa 1:100. In weiteren Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe (Wilner et al. 1976) konnte die unterschiedliche Spezifität der Antiseren darauf zurückgeführt werden, daß die Hapten-Eigenschaft von verschiedenen Abschnitten des Fibrinopeptid-A-Moleküls ausgehen kann: Antigenität des C-terminalen Abschnitts führte zu wesentlich höherer Spezifität des vom immunisierten Kaninchen gewonnenen Antiserums als Antigenität des N-terminalen Abschnitts. Es sollte also möglich sein, durch Konstruktion eines entsprechenden immunogenen Peptids zur reproduzierbaren Herstellung hochspezifischer Antiseren gegen Fibrinopeptid A zu gelangen.

II. Kapitel

Der Radioimmunoassay von Fibrinopeptid A

Originalmethode

Abschnitt A

Technik und eigene Erfahrungen

Die nun folgende kurze Darstellung des Radioimmunoassays von Fibrinopeptid A in seiner ursprünglichen Form stützt sich im wesentlichen auf die Veröffentlichungen der Erstbeschreiber (Nossel et al. 1971 und 1974), wo die genauen Einzelheiten der Methodik nachzulesen sind. Die von uns bei der Einführung dieser Originalmethode gemachten Erfahrungen sind in den betreffenden Unterabschnitten wiedergegeben. Im Interesse einer prägnanten Textdarstellung werde ich für Fibrinopeptid A die Abkürzung FPA, für Radioimmunoassay die Abkürzung RIA verwenden.

1. Gewinnung von Antiserum

FPA ist aus immunbiologischer Sicht ein kleines Molekül und besitzt als solches lediglich Hapten-Eigenschaften. Zur Erlangung immunogener Potenz muß es daher an ein geeignetes Trägerprotein gekoppelt werden. Hierzu haben sich bei FPA sowohl die von Goodfriend und Mitarbeitern (1964) erstmals für Bradykinin beschriebene Methode der Koppelung an menschliches Albumin mittels Carbo-diimid als auch die von Nossel und Mitarbeitern (1974) selbst vorgestellte Technik der N-terminalen Koppelung an Humanalbumin mittels Glutaraldehyd als geeignet erwiesen. Mit dem so erhaltenen Vollantigen werden

weiße Neuseeland-Kaninchen gemäß einem vorgeschriebenen Injektionsschema immunisiert. In der Regel können nach drei Monaten die spezifischen Antiseren gewonnen werden. Für unsere eigenen Untersuchungen haben wir fertiges Antiserum aus dem von der Firma IMCO (Grev Turegatan 8, S-114 46 Stockholm) in den Handel gebrachten Reagenziensatz für den RIA von FPA benützt. Dieser Reagenziensatz enthält außerdem auch Desamino-tyrosyl-FPA zur Markierung sowie standardisiertes FPA für die Erstellung der Eichkurve.

2. Standard-FPA

Zur Eichung des Assays wird hochgereinigtes, standardisiertes FPA benötigt. Natives FPA kann hierzu nach der von Blombäck und Mitarbeitern (1966) angegebenen Technik aus menschlichem Fibrinogen präpariert werden. Alternativ kann eine in-toto-Synthese des aus 16 Aminosäuren zusammengesetzten Peptids nach der solid-phase-Methode von Merrifield (1969) durchgeführt werden. Wie bereits erwähnt, ist standardisiertes FPA im Reagenziensatz der Firma IMCO enthalten.

3. Tyrosyl-FPA und Radiomarkierung

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten "Spürsubstanz", im nuklearmedizinischen Jargon als "Tracer" bezeichnet, muß das Peptid mit Jod-125, einem gamma-strahlenden Isotop des Halogens mit einer Halbwertszeit von 60,2 Tagen und einer Quantenenergie von 35 keV, gekoppelt werden. Da natives FPA keine jodinierbaren Aminosäuren enthält, wird es zunächst am N-terminalen Pol mit Tyrosin oder Desaminotyrosin nach der von Goodfriend und Ball (1969) für Bradykinin angegebenen Methode verestert. Fertiges Desaminotyrosyl-FPA ist ebenfalls

im Reagenziensatz der Firma IMCO enthalten. Die Radiojod-Markierung erfolgt nach der erstmals von Hunter und Greenwood (1962) für Wachstumshormon beschriebenen Chloramin-T-Methode:

Lösungen und Reagenzien:

1. Tris-HCl-Puffer pH 7,5:
Tris 0,05 M
NaCl 0,10 M
Merthiolat 0,2 g/l
Ovalbumin 0,1 % frisch zugesetzt.
2. Natriumphosphat-Puffer 0,5 M pH 7,5.
3. Jodid-125 als Kaliumsalz 0,5 mCi in 10 μ l (Hoechst).
4. Desamino-tyrosyl-FPA aus dem Reagenziensatz der Fa. IMCO, 2,5 μ g in 5 μ l NH_4HCO_3 0,1 M.
5. Chloramin T 25 mg in 8 ml Phosphat-Puffer (2) unmittelbar vor der Markierung aufgelöst.
6. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Natriumpyrosulfit) 25 mg in 8 ml Phosphat-Puffer (2).
7. Ovalbumin 1 % in Tris-HCl-Puffer (1) zum Desaktivieren des Dextran-Gels der Chromatographie-Säule vor dem Auftragen des Reaktionsgemischs.
8. Sephadex G-10 (Pharmacia) etwa 10 ml in Tris-HCl-Puffer (1) für die Trennsäule.

Die Radiomarkierung muß unter Beachtung der Strahlenschutz-Vorschriften in einem eigens dafür vorgesehenen Abzug durchgeführt werden. Gleichfalls im Interesse des Strahlenschutzes verwenden wir nur ein Zehntel der von

Nossel und Mitarbeitern (1971) angegebenen Radiojod-Aktivität und erzielen bei einer Substratmenge von 2,5 µg eine spezifische Aktivität des markierten Peptids von 100 - 130 µCi/µg.

In einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß werden zunächst das Jodid-125 und Desaminotyrosyl-FPA in 30 µl Phosphatpuffer (2) vermischt. Die Jodinierungsreaktion wird durch Zugabe von 10 µl der unmittelbar vorher hergestellten Lösung von Chloramin T gestartet und etwa 10 Sekunden später mit 20 µl der Natriumpyrosulfit-Lösung gestoppt (jedesmal gut schütteln). Nach Zugabe von 50 µl der 1 %igen Ovalbuminlösung und 200 µl Phosphatpuffer (2) kann das Reaktionsgemisch vollständig in einer Pasteur-Pipette aufgenommen und auf eine etwa 12 cm hohe Sephadex-G-10-Säule übertragen werden. Mit Tris-HCl-Puffer lassen sich in Fraktionen zu je 0,8 - 1,0 ml zuerst das markierte Peptid ("Tracer") und später, sauber von diesem abgesetzt, das nicht zur Reaktion gekommene Jodid-125 eluieren.

Das Ergebnis einer nach dieser Vorschrift durchgeführten Markierung ist in Abb. 1 dargestellt. Die schraffierte Fraktion Nr. 5 weist hier die größte Aktivität auf und wird zur Herstellung der Tracer-Lösung weiterverwendet. Der Rest des Eluats wird unter Beachtung der Strahlenschutzvorschriften verworfen.

Markiertes Desaminotyrosyl-FPA bewahren wir zur Vermeidung größerer Verluste an immunologisch aktivem Peptid durch Radiolyse, welche durch hohe räumliche Dichte der Aktivität begünstigt wird (Erhardt und Scriba 1974), in der bereits fertigen Endverdünnung (etwa 20 000 cpm in 100 µl Pipettiervolumen) tiefgefroren in testgerechten Portionen auf. Infolge seines natürlichen Verlustes an Aktivität (Halbwertszeit 60,2 Tage) ist es nur 4 - 6 Wochen lang für den RIA verwendbar.

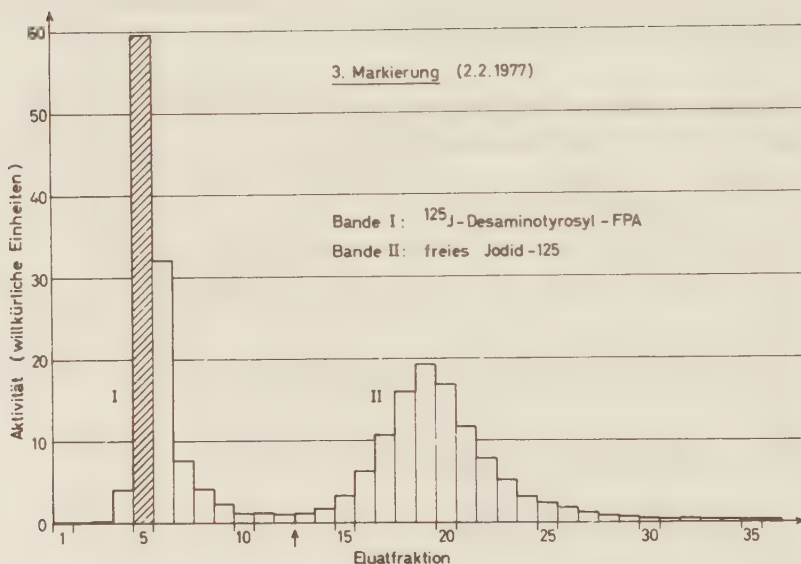


Abb. 1: Beispiel einer Markierung von $2,5 \mu\text{g}$ Desaminyrosyl-FPA mit $0,5 \text{ mCi}$ Jodid- ^{125}I .

Die einzelnen Eluatfraktionen haben jeweils das gleiche Volumen von etwa 1 ml . Ihre relative Aktivität ist durch die Höhe der Säulen wiedergegeben. Aus dem Verhältnis der summierten relativen Aktivitäten der Peptid- und der Jodidbande - die rechnerische Trenngrenze ist in der Abb. durch Pfeil an der Abszisse bezeichnet - sowie aus den obigen Mengenangaben läßt sich die spezifische Aktivität des markierten Peptids annähernd berechnen. Sie beträgt hier $100 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

4. Blutentnahme und Verarbeitung

Für eine Bestimmung der FPA-Plasmakonzentration müssen 5 ml Vollblut abgenommen werden. Zur sofortigen Hemmung proteolytischer Aktivitäten in der entnommenen Blutprobe werden in einer 5-ml-Spritze 0,5 ml einer Lösung von 1 000 USP-E/ml Heparin (Natriumsalz) und 1 000 KIE/ml Aprotinin (Handelsname Trasylol) in physiologischer Kochsalzlösung vorgelegt. Die Heparin-Trasylol-Lösung kann in einem 50-ml-Fläschchen mit physiologischer Kochsalzlösung vorbereitet und im Kühlschrank etwa 4 Wochen lang aufbewahrt werden.

Bei der Blutentnahme muß auf absolut einwandfreie venöse Punktionstechnik geachtet werden. Ein ungewolltes Zumischen von Gewebs-Thrombokinasen kann zu falsch erhöhten FPA-Werten führen. Nach Verwerfen der ersten Bluttropfen wird Blut blasenfrei in die vorbereitete Spritze bis zur 5-ml-Marke aufgezogen. Nach der Blutentnahme muß der Inhalt der Spritze sofort durch mehrmaliges Schwenken unter Vermeidung von Schaumbildung durchgemischt werden. Blut aus Kathetern bzw. aus bereits länger liegenden Kanülen ist ungeeignet.

Die Blutprobe wird möglichst unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert (20 Min. bei 2000 g und 4°C). 2 ml des Plasmaüberstands werden in ein neues Plastikröhrchen abpipettiert. Das Heparin-Trasylol-Plasma kann nun entweder sofort der Alkoholfällung und Dialyse zugeführt oder bei minus 40°C tiefgefroren werden.

Die Stabilität von Fibrinopeptid A in Plasmaproben bei Zimmertemperatur haben Qureshi und Nossel (1972) untersucht: Nach 24 Stunden gehen in den heparinisierten Proben 50 bis 65 %, nach 7 Tagen etwa 85 % des ursprünglichen, radioimmunologisch nachweisbaren Gehalts an FPA verloren. Nach eigenen Untersuchungen bleibt der FPA-Gehalt

in Heparin-Trasylool-Plasma bei Zimmertemperatur für etwa 4 Stunden konstant, um dann uncharakteristisch nach oben oder unten abzuweichen.

5. Äthanol-fällung

Die Aufbereitung der Plasmaproben für den Assay beginnt mit der Ausfällung von Fibrinogen und löslichen Fibrin-komplexen ("Kryofibrin") durch Zusatz von Äthylalkohol in einem Mischungsverhältnis von 50 %. Tiefgefrorene Plasmaproben werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und bis zur Auflösung des möglicherweise erscheinenden Kryopräzipitats im Wasserbad belassen (vorsichtig schütteln). 2 ml Heparin-Trasylool-Plasma werden zügig ("im Schuß"), aber unter Vermeidung von Schaumbildung (Pipettenspitze der Röhrchenwandung anlegen) mit 2 ml Äthanol 100 % versetzt und durchmischt, wobei sich sofort reichlicher Niederschlag bildet. Nach 30 Minuten Stehen-lassen bei 4 °C wird der Niederschlag abzentrifugiert (20 Minuten bei 2 000 g und 4 °C). Der in neue Plastik-röhrchen abdekantierte Überstand wird wiederum bei 4 °C 30 Minuten lang stehengelassen, wobei sich der Ansatz nochmals durch Bildung eines Restniederschlags leicht trübt. Nach erneutem Zentrifugieren (20 Minuten bei 2 000 g und 4 °C) gelangen 2 ml des nunmehr klaren Überstands zur Weiterverarbeitung durch Dialyse.

6. Dialyse

Der nun sich anschließende Dialyse-Schritt soll sicher-stellen, daß in den Alkohol-defibrinierten Plasmaproben etwa noch vorhandene Fibrinogen-Spaltprodukte nicht in den Testansatz des Assays gelangen. Dabei muß ein-schränkend angemerkt werden, daß die spätphasigen Fragmente E und Y der Plasmin-induzierten Fibrinolyse

dialysierbar sind. Ihr Einfluß auf die beim RIA erhaltenen Meßwerte bleibt daher nicht voraussagbar und stellt einen Unsicherheitsfaktor für die Spezifität des Assays dar.

2 ml Überstand aus der Äthanol-fällung werden in ein einseitig verschlossenes, gut 10 cm langes Stück Dialysierschlauch (Durchmesser 6,4 mm, Union Carbide, Chicago) einpipettiert. Anschließend wird der Dialysierschlauch dicht verschlossen (knicken, absichern mit Bindfaden oder wasserfestem Klebeband) und in ein vorbereitetes Plastikröhrchen mit genau 8 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,5 (Tris 0,05 M, NaCl 0,10 M, Merthiolat 0,2 g/l, Ovalbumin 0,1 % frisch zugesetzt) eingesetzt. Die verschlossenen Röhrchen mit den Dialyse-Ansätzen der Plasmaproben werden in den Halterungen eines geeigneten Schwenkgeräts (langsames Kippschwenken) solcherart befestigt, daß eine kontinuierliche Durchmischung von Plasmaproben innerhalb und Dialysierflüssigkeit außerhalb der Membranschläuche durch auf- und abwandernde Luftblasen erfolgt. Die Dialyse geschieht zweckmäßigerweise über Nacht (Gesamtdauer 12 - 18 Stunden). Nach Abschalten der Schwenkvorrichtung werden die in den Membranschläuchen eingeschlossenen Plasmaproben aus den Dialysaten entfernt und verworfen. Letztere haben sich als sichtbares Zeichen einer erfolgreichen Dialyse je nach Bilirubin-Gehalt des Plasmas mehr oder weniger stark gelblich eingefärbt.

Anhand mitgeführter Kontrollen konnten wir feststellen, daß der Wirkungsgrad der Dialyse für FPA nahezu 100 % beträgt, daß also ein praktisch vollständiger Ausgleich der Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Dialysmembran stattfindet. Die hiervon abweichenden Literaturangaben von 75 - 100 % (Nossel et al. 1974) und 55 - 60 % (Kockum 1976) können vielleicht dadurch erklärt werden, daß wir die Dialyse im Unterschied zu den genannten Autoren nicht bei 4 °C, sondern bei Zimmertemperatur

durchführen. Zudem gewährleistet das Prinzip der auf- und absteigenden Luftblasen die Aufrechterhaltung eines stets optimalen transmembranalen Konzentrationsgradienten. Bei Berücksichtigung der genannten Volumina von 2 ml für die Plasmaprobe bzw. 8 ml für das Dialysat läßt sich demnach ein Verdünnungsfaktor von 5-fach veranschlagen.

7. Der RIA

Der eigentliche Radioimmunoassay, in welchem der FPA-Gehalt der Dialysate in drei Verdünnungsstufen bestimmt wird, dauert einschließlich Inkubationszeiten und szintimetrischer Auszählung der Ansätze in seiner ursprünglichen Form insgesamt zwei Tage. Am ersten Tag werden die RIA-Ansätze zur 1. Inkubation vorbereitet. In dieser "kalten" Vorinkubation wird die Dialysat-Probe mit dem spezifischen Antiserum zur Reaktion zusammengeführt. Erst am nächsten Tag kommt der markierte "Tracer" hinzu, der während der nun folgenden 2. Inkubation Gelegenheit erhält, die noch unbesetzten Stellen am Antikörper auszufüllen im Sinne einer Konkurrenz zwischen Prüf-Antigen (hier FPA aus der Dialysat-Probe) und Vergleichs-Antigen (Tracer). Diese wesentlich kürzere "heiße" Inkubation wird beendet durch Präzipitation des nicht Antikörper-gebundenen Antigen-Anteils, seine Entfernung aus den Ansätzen durch Zentrifugation und die szintimetrische Auszählung eines definierten Volumenanteils des Überstands, aus welcher sich schließlich die FPA-Konzentration in der Dialysat-Probe anhand einer Standardkurve ableiten läßt.

Lösungen und Reagenzien:

1. Tris-HCl-Puffer pH 8,5:

Tris 0,05 M, NaCl 0,10 M, Merthiolat 0,2 g/l,
Ovalbumin 0,1 % frisch zugesetzt.

2. Äthanol reinst.

3. In testgerechter Verdünnung vorbereitete Lösungen aus dem Reagenziensatz der Fa. IMCO:

- Anti-FPA-Kaninchenserum: die geeignete Endverdünnung, bei der 30 bis 50 % des Tracers gebunden werden (Tracer-Bindungskapazität B_0), muß für jede neue Charge Kaninchenserum in einem Vorversuch ermittelt werden (siehe Abb. 2).
- Jod-125-markiertes Desaminotyrosyl-FPA in einer Endverdünnung, die in 100 μ l Pipettivolumen eine Aktivität von etwa 20 000 cpm enthält ("Tracer-Lösung", siehe Unterabschnitt 3).
- Standard-FPA in einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe beginnend bei 2 ng/100 μ l.

4. Aktivkohle-Suspension:

Aktivkohle 2,5 g, Ovalbumin 0,3 g, ad 100 ml Tris-Puffer (1); homogene Suspension wird durch Magnetrührer aufrechterhalten.

Für die Aufnahme der Inkubationsansätze werden Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße ohne Deckel vorbereitet und fortlaufend nummeriert. Die reihenweise in geeigneten Ständern aufgestellten Gefäße werden während der Inkubationszeiten mit Klebefilm-Streifen verschlossen.

Wir haben für jede zu bestimmende FPA-Konzentration Doppelansätze, für jeden Wert der Standardkurve Dreifachansätze durchgeführt. Jedes Dialysat wurde in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:4 und 1:16 gemessen, um den Meßbereich nach oben zu erweitern. Zur Herstellung der beiden letztgenannten Verdünnungsstufen wurde das Dialysat

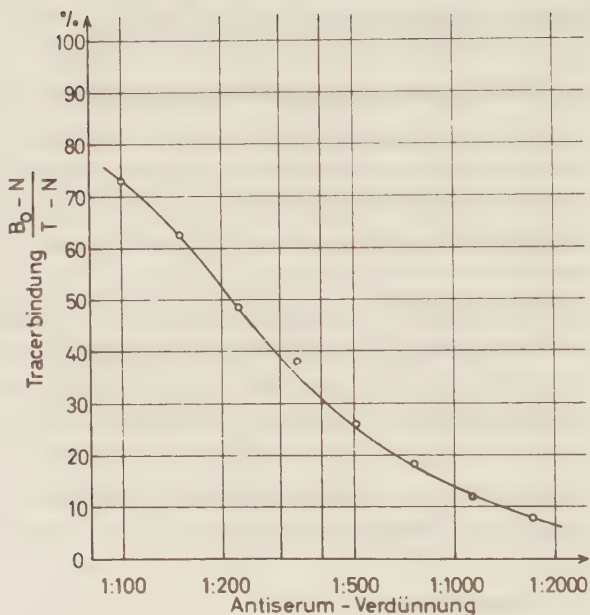


Abb. 2: Titration des Anti-FPA-Kaninchenserums zur Ermittlung der optimalen Verdünnung.

B_0 = Tracer-Bindungskapazität des Antiserums in Abwesenheit von nativem FPA, "Standard-Leerwert", "Antiserum-Kontrollwert".

T = Totale Tracer-Aktivität in Abwesenheit von Aktivkohle, "Puffer-Kontrollwert".

N = Nullwert in Abwesenheit von Antiserum, "Kohle-Kontrollwert".

Die Antiserum-Verdünnung für den Test-Ansatz (Pipettier-Volumen 100 μ l) soll so gewählt werden, daß die Tracer-Bindungskapazität 30 - 50 % beträgt.

mit entsprechenden Mengen einer Lösung von 10 % Äthanol in Tris-HCl-Puffer versetzt. 500 μ l der Dialysat-Probe gelangen in einen Ansatz des RIA, wo sie zunächst mit 100 μ l der Antiserum-Verdünnung versetzt werden. Nach einer Inkubationszeit von etwa 20 Stunden werden 100 μ l Tracerlösung zugegeben, mit der eine 2-stündige Inkubation erfolgt. Abschließend werden 500 μ l der Aktivkohle-Suspension zugesetzt, die genau 5 Minuten lang auf den Ansatz einwirken soll. Auf Einhaltung dieser kritischen Zeitspanne muß unbedingt geachtet werden, da bereits kleine Abweichungen die Bindung von Aktivität verändern können. Nach scharfer Zentrifugation (10 Minuten bei 5 000 g und 4 °C) wird 1 ml des Überstands in ein neues Gefäß pipettiert und in einem Szintillationszähler mit automatischem Probenwechsel (Tracerlab, Gammaguard) ausgezählt (1 oder 2 Minuten pro Ansatz).

Zweckmäßigerweise werden eine größere Anzahl von Plasma-proben zu einer Serie zusammengefaßt, innerhalb welcher die einzelnen Verarbeitungsschritte für alle Ansätze gleichzeitig erfolgen. Für jede solche Serie wird eine eigene Standardkurve mitgeführt. Die Ansätze der Standardkurve entstammen einer geometrischen Verdünnungsreihe des FPA-Standards, wobei eine entsprechende Korrektur auf 500 μ l Probenvolumen durch Puffer-Zugabe sowie auf 10 % Äthanolgehalt vorgenommen wird, um vergleichbare Reaktionsbedingungen sicherzustellen. Abb. 3 gibt eine in dieser Weise ermittelte Standardkurve wieder. Dabei wird die Zählrate in Abwesenheit von nativem FPA, die der maximalen Tracer-Bindungs-kapazität des Antiserums, B_0 , entspricht, mit 0 % definiert. Sie wird ermittelt durch gänztliches Weglassen von Standard-FPA aus dem Ansatz und heißt daher auch "Standard-Leerwert" oder "Antiserum-Kontrollwert". Auf der anderen Seite der Ordinaten-skala bedeuten 100 % das völlige Fehlen einer Tracer-Bindung an den Antikörper, wie es bei sehr hoher Konzentration von nativem FPA im Ansatz der Fall wäre. Die hierfür

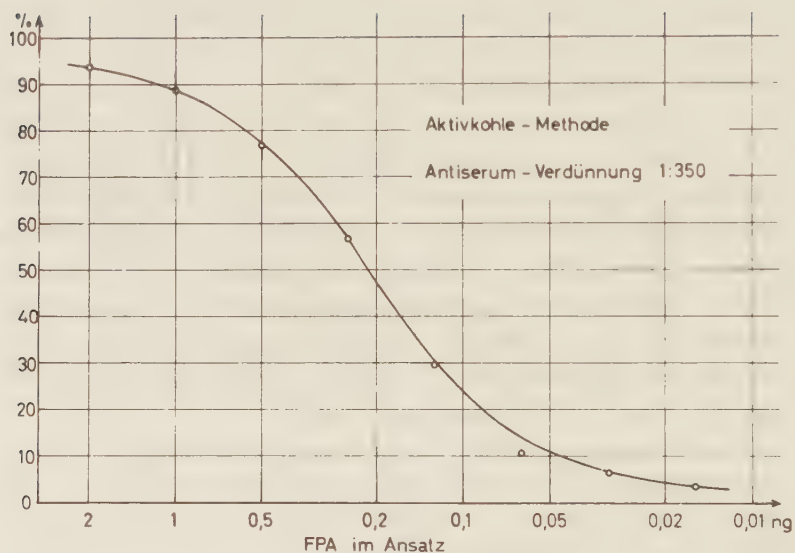


Abb. 3: Standardkurve.

Erklärung der Prozent-Skalierung der Ordinate
im Text.

Wird anstelle der halblogarithmischen Auftragung
eine log-Probit-Darstellung verwendet, so ergibt
sich ein angenähert linearer Kurvenverlauf, der
die graphische Konstruktion einer Regressions-
geraden zuläßt.

gültige Zählrate wird ermittelt durch gänzliches Weglassen des spezifischen Antiserums aus dem Ansatz und heißt auch "Nullwert" oder "Kohle-Kontrollwert", da sie ausschließlich von nicht Kohle-absorbierbarer Aktivität herrührt.

8. Auswertung

Der erste Schritt der Auswertung besteht darin, die szintimetrischen Zählraten gemäß der oben definierten Skala in die entsprechenden Prozentwerte umzurechnen. Anschließend wird auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve gezeichnet nach dem Beispiel der Abb. 3. Die Kurve hat in dieser Darstellungsweise einen gesetzmäßigen, S-förmigen Verlauf. Die graphische Auswertung läßt sich wesentlich vereinfachen, wenn anstelle der halblogarithmischen Darstellung eine "log-Probit-Skalierung" benutzt wird, bei welcher die Ordinate nach den Gesetzen der Normalverteilung gegen die asymptotischen 0 %- und 100 %-Marken hin zunehmend gedehnt erscheint. In solcher Auftragung wird mit guter Annäherung eine Linearisierung erreicht, so daß eine graphische Regressionsgerade ermittelt werden kann. Entsprechendes "log-Probit-Papier" ist im Fachhandel erhältlich.

Anhand der Standardkurve lassen sich nun aus den ebenfalls in Prozentwerte umgerechneten Zählraten der Dialysat-Probenansätze (jeweils Mittelwerte der Doppelbestimmungen) die zugehörigen FPA-Werte ablesen. Diese geben die absolute Menge von FPA an, die im RIA-Ansatz vorgelegen hat. Sie entstammt einem Dialysat-Pipettiervolumen von 500 μ l, muß also zur Errechnung von Konzentrationen pro ml mit dem Faktor 2 multipliziert werden (Volumenfaktor). Weiterhin sind die Verdünnungsfaktoren der Äthanol-fällung (2-fach) sowie der Dialyse (5-fach) zu berücksichtigen, so daß der Gesamt-Korrekturfaktor 20 beträgt. Mit diesem Faktor sind

die aus der Standardkurve ermittelten FPA-Werte zu multiplizieren, um die zugehörigen FPA-Plasmakonzentrationen zu erhalten. In dieser Berechnungsweise wird die geringfügige Verdünnung der Blutprobe in der Entnahmespritze durch die Heparin-Trasylol-Vorlage vernachlässigt.

Als Beispiel soll anhand der Abb. 3 diejenige FPA-Plasmakonzentration errechnet werden, bei der die Standardkurve die 50 %-Marke durchschneidet. Der zugehörige FPA-Wert im RIA-Ansatz wird im nuklearmedizinischen Sprachgebrauch mit "50 %-Intercept" bezeichnet und liefert ein gut reproduzierbares Maß für die Empfindlichkeit des Assays. Er beträgt in unserem Beispiel 0,22 ng. Hieraus ergäbe sich eine Plasmakonzentration von 4,4 ng/ml. Dieser Wert ist keineswegs identisch mit der unteren Nachweisgrenze des Assays, die von der Standardabweichung des Standard-Leerwerts (= 0 %-Marke) abhängt und von Serie zu Serie stark variiert.

Abschnitt B

Diskussion und Fragestellungen

Die Einführung des Radioimmunoassays in der beschriebenen Form brachte eine Reihe von Problemen mit sich, die hier kurz angerissen werden sollen:

1. Der gesamte Ablauf der Bestimmung von FPA in Plasma-Proben beansprucht drei volle Arbeitstage. Abgesehen vom erforderlichen Arbeitsaufwand bedeutet dies in klinischen Bezügen, daß solch ein langwieriger Test für die Differentialdiagnose und Therapie akuter Störungen der Hämostase praktisch bedeutungslos ist. Die Bestimmung von FPA-Spiegeln hätte bei solchen Erkrankungen für klinische Belange höchstens Dokumentationswert.
2. In der vorliegenden Form enthält das Testverfahren einige kritische, unhandliche Teilschritte, welche nach sorgfältiger Ausführung verlangen, wenn die Verlässlichkeit der Ergebnisse nicht aufs Spiel gesetzt werden soll. Hierzu zählen vor allem die Dialyse der defibrinierten Plasma-Proben und die Aktivkohle-Adsorptionstechnik zur Abtrennung freien Tracer-Peptids aus den RIA-Ansätzen.
3. Die graphische Auswertung der Zählraten-Ergebnisse ist mühsam und zeitaufwendig. Sie erfordert zudem die Verwendung von Millimeter-Papier mit spezieller Achsenskalierung, um eine angenäherte Linearisierung der Standardkurve zu erreichen. Die dabei verwendete mathematische Modellfunktion wird dem tatsächlichen Reaktionsverhalten von spezifischem Antikörper und Tracer bzw. nativem FPA nur unvollkommen gerecht und bedingt unvermeidbare Ungenauigkeiten in der graphischen Konstruktion der Eichgeraden.

4. Die beschriebene Technik der Äthanol-fällung und Dialyse zur Aufbereitung der Plasma-Proben kann einen sicheren Ausschluß kleinmolekularer Spaltprodukte des Fibrinogens aus der Plasmin-induzierten Spätphase der Fibrinolyse von den Ansätzen des Assays nicht gewährleisten. Damit ist die Spezifität des Assays und seine Aussagekraft in der Differentialdiagnose von Zuständen primärer Hyperkoagulabilität und primärer Hyperfibrinolyse eingeschränkt.

Wir haben versucht, eine Reihe dieser Probleme durch Modifikationen des Testverfahrens anzugehen, über die im folgenden Kapitel berichtet wird. Ziel war die Ausarbeitung einer Technik, die einen raschen, unkomplizierten Ablauf sowohl der Aufbereitung der Plasma-Proben als auch des eigentlichen Radioimmunoassays gestattet unter Gewährleistung hoher Empfindlichkeit und Spezifität.

III. Kapitel

M o d i f i k a t i o n e n

Abschnitt A

Präzipitation durch zweiten Antikörper ("Doppel-Antikörper-Methode")

1. Prinzip

In dem Bestreben, die mit der Aktivkohle-Adsorption verbundenen Nachteile zu vermeiden, haben wir bald nach Einführung des Assays die Doppel-Antikörper-Technik erprobt, die von Morgan und Lazarow (1962) erstmals für Insulin beschrieben wurde und sich in unserem Hause bei vielen Hormonbestimmungen durch RIA bewährt hat (Erhardt et al. 1973).

Bei diesem Verfahren wird dem fertig inkubierten RIA-Ansatz ein zweiter, gegen den spezifischen Anti-FPA-Antikörper gerichteter, präzipitierender Antikörper in geeigneter Verdünnung zugesetzt. Es liegt also ein doppeltes Antigen-Antikörper-System vor. Das am spezifischen, "ersten" Antikörper gebundene Antigen (natives FPA bzw. Tracer) gelangt mit jenem ins Präzipitat und kann somit durch Zentrifugation sedimentiert werden. Die mit dem Sediment assoziierte, von gebundenem Tracer herrührende Aktivität wird nach Entfernung des Überstands szintimetrisch ausgezählt und liefert wiederum ein eichfähiges Maß für die im Ansatz vorgelegene Menge an nativem FPA.

Da das spezifische Antiserum ("1. Antikörper") im Interesse einer ausreichend hohen Empfindlichkeit des Assays in sehr hoher Verdünnung vorliegt, ist es erforderlich, dem Ansatz eine bestimmte Menge unspezifisches Kaninchen-gamma-Globulin

zuzufügen, welches die im zweiten Antigen-Antikörper-System zur Präzipitation nötige Antigen-Konzentration bereitstellt. Aufgrund dieser Verstärker-Funktion bezeichnet man das unspezifische Kaninchen-Serum auch kurz mit dem Jargon-Begriff "Booster-Serum". Es wird zweckmäßigerweise zusammen mit dem spezifischen Antiserum (1. Antikörper) den Ansätzen zupipettiert.

2. Titration des zweiten Antikörpers

Als zweiten Antikörper haben wir im Handel erhältlichs Anti-Kaninchen-Präzipitationsserum vom Esel (Fa. Wellcome, Beckenham) verwendet. Gereinigtes, unspezifisches Kaninchen-gamma-Globulin ("Booster-Globulin") bezogen wir von der Fa. Serva (Heidelberg).

Die günstigsten Konzentrationen von Präzipitationsserum und Booster-Globulin mußten durch Titration ermittelt werden. Hierzu wurden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen Ansätze wie zum RIA vorbereitet. Lösungen und Reagenzien sind im übrigen mit Ausnahme der Aktivkohle-Suspension dieselben wie bei der Originalmethode aufgeführt (siehe II. Kapitel, Abschnitt B,7).

100 μ l endverdünnte Tracerlösung wurden mit 100 μ l Anti-FPA-Serum in der Verdünnung von 1:400 und 500 μ l Tris-HCl-Puffer vermischt und 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Jeder Ansatz enthielt außerdem 3,5 bzw. 7,0 μ g Booster-Globulin. Nach Beendigung der Inkubation wurden jedem Ansatz 100 μ l Anti-Kaninchen-Eselserum aus einer geometrischen Verdünnungsreihe hinzupipettiert. Für jede Verdünnungsstufe des Eselserums wurden Dreifachansätze durchgeführt. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei Zimmertemperatur wurden alle Ansätze zentrifugiert (10 Minuten bei 4 000 g und 4 °C) und die Überstände mit Hilfe eines Über ein zwischen-

geschaltetes Sammelgefäß (Strahlenschutz!) an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen, rüsselförmigen Schlauchstücks bis auf einen kleinen Rest von etwa 30 μ l abgesaugt. Schließlich gelangten die sedimentierten Rückstände in den Eppendorf-Gefäßen zur Auszählung im Szintillationszähler (Tracerlab, Fa. Gammaguard).

Das Ergebnis dieser Titration zeigt Abb. 4. Die einzelnen Meßpunkte stellen die präzipitierbare Tracer-Bindungskapazität des spezifischen Antiserums in Abwesenheit von nativem FPA dar (vergleiche hierzu die Titrationskurve des spezifischen Antiserums in Abb. 1). Sie variiert in Abhängigkeit von der Konzentration des zweiten Antikörpers sowie des Booster-Globulins.

Günstige Arbeitsbedingungen liegen vor bei hoher präzipitierbarer Tracerbindungskapazität und flachem Verlauf der Titrationskurve. Letztere Forderung ergibt sich aus der Überlegung, daß geringfügige Pipettierfehler sich möglichst wenig der präzipitierten Tracer-Aktivität mitteilen sollen. Anhand der Abb. 4 lassen sich somit als günstigste Arbeitsbedingungen folgende Alternativen ablesen:

1. Booster-Globulin 7 μ g/Ansatz, 2. Antikörper 1:12;
2. Booster-Globulin 3,5 μ g/Ansatz, 2. Antikörper 1:24.

Im Interesse einer kostengünstigen Lösung haben wir uns für die zweite Konstellation entschieden. Sicher lassen sich durch Probieren noch günstigere Arbeitsbedingungen mit noch weniger Verbrauch an zweitem Antikörper heraus-titrieren.

Es ist ratsam, für jede frisch gelieferte Charge von Eselserum sowie von unspezifischem Kaninchen-gamma-Globulin eine neue Titrationskurve zu erstellen und die günstigsten Arbeitsbedingungen jeweils neu zu definieren.

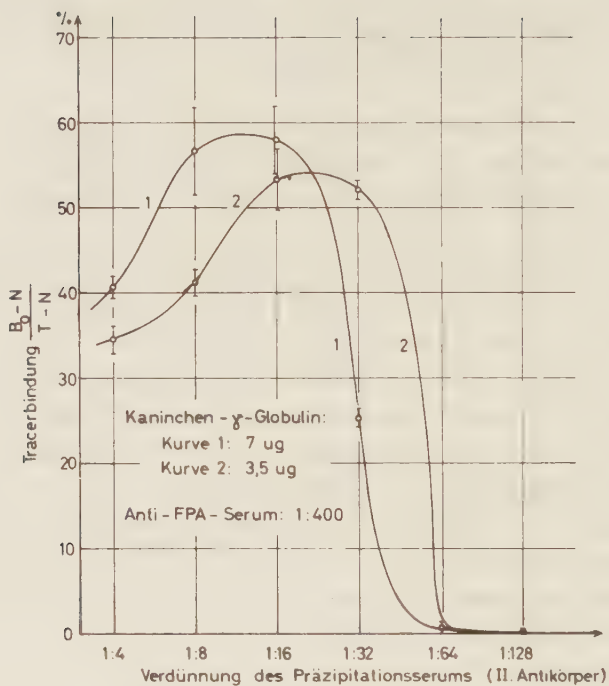


Abb. 4: Titrationskurve des zweiten Antikörpers.

Die Kurve wurde für zwei verschiedene Konzentrationen von unspezifischem Kaninchen-gamma-Globulin erstellt. Die angegebenen Verdünnungsverhältnisse gelten für ein Pipettiervolumen von 1:100. Aus dem Kurvenverlauf dieser Titration lassen sich die günstigsten Arbeitsbedingungen ablesen.

Um die Frage zu klären, welchen zeitlichen Verlauf die Präzipitationsreaktion aufweist, haben wir die Inkubationszeit mit dem zweiten Antikörper bei konstanten Arbeitsbedingungen (Booster-Globulin 3,5 µg, 2. Antikörper 1:24, Zimmertemperatur) variiert. Dabei konnten wir feststellen, daß die Tracerbindung im Präzipitat nach 30 Minuten bereits 90 % und nach 1 Stunde 100 % der maximal präzipitierbaren Aktivität erreicht, um im weiteren Verlauf ganz allmählich wieder leicht abzufallen. Somit kann die Inkubationszeit für die Präzipitation (3. Inkubation) auf 1 Stunde festgelegt werden, wobei eine versehentliche längere Inkubation keine nennenswerten Nachteile zur Folge hat. Gerade diese Tatsache der relativen zeitlichen Indifferenz verdient es, gegenüber der Aktivkohle-Adsorptionstechnik als Vorzug hervorgehoben zu werden, da sie die Handhabung des Assays wesentlich erleichtert.

3. Gesamtablauf

Die im Gesamtablauf des RIA erforderlichen Änderungen ergeben sich zwanglos aus den beschriebenen Untersuchungen. Dem spezifischen Antiserum wird bei seiner Vorbereitung in Endverdünnung so viel Kaninchen-gamma-Globulin zugesetzt, daß in 100 µl Pipettiervolumen 3,5 µg enthalten sind. Nach Beendigung der "heißen" 2. Inkubation erhalten alle Ansätze 100 µl präzipitierendes Eselserum in der Verdünnung von 1:24 und treten damit in die 3. Inkubation ein, die 1 Stunde dauert. Nach Zentrifubation (10 Minuten bei 4 000 g und 4 °C) werden die Überstände bis auf einen kleinen Rest von 30 µl abgesaugt. Die Rückstände werden in denselben Gefäßen szintimetrisch ausgezählt.

Den gesamten Ablauf des Radioimmunoassays mit der Doppel-Antikörper-Methode haben wir in einer früheren Veröffentlichung (Schramm et al. 1977) ausführlich dargestellt. Dort ist auch ein genaues Pipettier- und Inkubationsschema für die RIA-Ansätze zu finden.

4. Inkubationszeiten

Die Durchführung einer Serie des RIA von Beginn der 1. Inkubation bis zur Auszählung der Ansätze nimmt in dieser Form zwei volle Tage in Anspruch. Den Hauptanteil an dieser für einen in klinischen Akutsituationen anzuwendenden Test viel zu langen "Wartezeit" beansprucht die erste Inkubation des spezifischen Antiserums mit der Probe. Nach Einführung der Doppel-Antikörper-Methode gingen wir daher der Frage nach, ob sich die Inkubationszeiten des Assays nicht vielleicht abkürzen ließen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung untersuchten wir zunächst die Kinetik der Bindung von Tracer an den spezifischen Antikörper unter den im RIA herrschenden Arbeitsbedingungen, also gewissermaßen die Kinetik des im RIA mitgeführten Kontrollwertes der Tracer-Bindungskapazität des Antiserums. Wir stellten fest, daß die Tracerbindung nach 30 Minuten 64 % der größtmöglichen Kapazität, nach 60 Minuten 77 % und erst nach 120 Minuten ihr volles Maximum erreicht, um dann allmählich wieder leicht abzusinken. Hieraus leiteten wir die Schlußfolgerung ab, daß die zweite Inkubation unter allen Umständen 2 Stunden dauern sollte, um das Plateau der Tracerbindung sicher zu erreichen.

Im Anschluß daran führten wir einen Assay von 0,5 ng des FPA-Standards unter Variation der ersten Inkubationszeit durch. Alle übrigen Bedingungen blieben konstant einschließlich der Dauer der zweiten Inkubation, die 2 Stunden betrug. Zu unserer Überraschung ergab dieser Versuch, daß bereits bei 30-minütiger kalter Vorinkubation fast die volle Empfindlichkeit des Assays mit 94 % des nach 18-stündiger Inkubation gemessenen Wertes erreicht wird. Bei 60 Minuten Dauer der ersten Inkubation beträgt die Empfindlichkeit $98 \% \pm 8 \%$ und ist somit von der maximalen Empfindlichkeit nicht mehr zu unterscheiden. Der Vollständigkeit halber sei hier noch der 15-Minuten-Wert mit 62 % vermerkt.

Dieses Ergebnis ermutigte uns dazu, die Dauer der ersten Inkubation radikal auf 2 Stunden zu verkürzen, so daß eine Durchführung des gesamten Assays innerhalb eines Arbeitstages möglich wurde. In der Tat konnten wir an den in der Folgezeit unveränderten Standardkurven ablesen, daß die volle Empfindlichkeit des Assays erhalten geblieben war.

5. Rechner-gestützte Auswertung

Die graphische Auswertung der Testergebnisse aus einer RIA-Serie anhand der Standardkurve ist recht mühsam und nimmt selbst bei Verwendung eines Taschenrechners noch ein bis zwei Stunden in Anspruch. Aus dieser Sicht befanden wir uns in der glücklichen Lage, daß an unserem Hause bereits ein Rechner-Programm zur Auswertung von Radioimmunoassays zur Verfügung stand, das von Marschner und Mitarbeitern (1974) eingeführt worden war. So konnten wir die Vorteile einer standardisierten Test-Auswertung und einer weiteren Ersparnis an Zeit und Mühe für den RIA von FPA nutzbar machen.

Das erwähnte Rechner-Programm verwendet zur Konstruktion der Standardkurve das Anpassungsmodell der kubischen Spline-Funktionen nach Reinsch in der Anwendung für den Radioimmunoassay durch Marschner und Mitarbeiter (1974). Bei diesem rechenaufwendigen und daher nur für die Computer-Auswertung geeigneten Verfahren wird der Rechner angewiesen, durch die Meßpunkte der geometrischen Standard-Verdünnungsreihe die "glatteste Kurve" zu legen. Dabei stellt der Kurvenverlauf zwischen zwei Meßpunkten jeweils einen Ausschnitt aus einer einfachen kubischen Funktion dar, welche sich "knickfrei" an die benachbarten Kurvenabschnitte anschließt. Der Grad der Glättung und damit gewissermaßen die Toleranz des Rechners in der Berücksichtigung "ausreißender" Meßpunkte kann durch Wahl eines sogenannten

Glättungsfaktors vorgegeben werden. Der große Vorteil der Spline-Funktionen besteht im Fehlen einer globalen Parametrisierung der Kurve, so daß auch weniger gesetzmäßige Kurvenverläufe gut nachvollzogen werden können.

Abb. 5 gibt die Nachzeichnung einer in dieser Weise vom Rechner erstellten und zur automatischen Auswertung benutzten Standardkurve wieder.

6. Diskussion

Die Einführung der Doppel-Antikörper-Methode erbrachte gegenüber der Aktivkohle-Technik folgende Vorteile:

1. Spezifische Fällung des ersten Antikörpers.

Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Aktivkohle lediglich um eine unspezifische Adsorption von Substanzen mit lipophilen Struktureigenschaften. Die höhere Spezifität führt zu einer deutlichen Anhebung der meßbaren Tracer-Bindungskapazität und somit zu einer Versteilerung der Standard-Eichkurve.

2. Plateau-Verlauf der Präzipitationsreaktion.

Demgegenüber scheint Aktivkohle in der Lage zu sein, bei längerer Einwirkungszeit FPA und Tracer aus der Bindung mit dem spezifischen Antikörper freizusetzen, da sie mit diesem um den in Lösung befindlichen Antigen-Anteil konkurriert ("Stripping-Effekt"). Die demzufolge kritische Handhabung der Aktivkohle-Technik bedingt einen Unsicherheits-Faktor hinsichtlich der Präzision der Testergebnisse, der durch die Doppel-Antikörper-Methode vermieden wird.

3. Auszählung der Proben in den für die Ansätze

benützten Gefäßen. Das bei der Aktivkohle-Technik

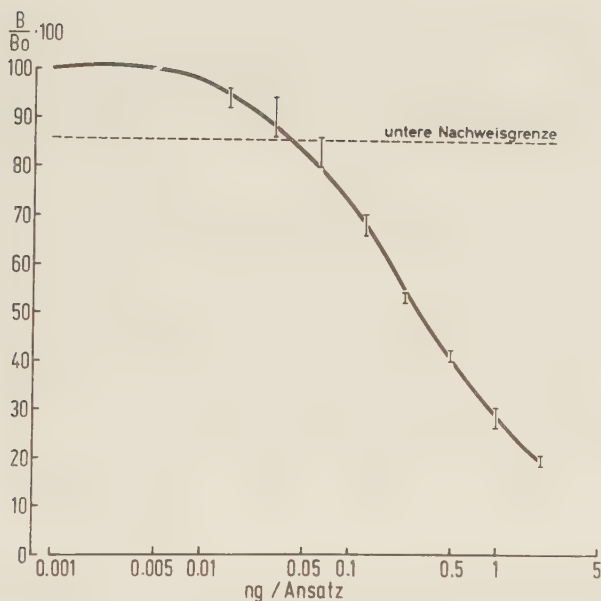


Abb. 5: Nachzeichnung der Standardkurve aus dem Rechner-Ausdruck der Auswertung einer RIA-Serie.

Der Kurvenverlauf veranschaulicht das sich eng an die vorgegebenen Meßpunkte anschmiegende Verhalten der aus kubischen Spline-Funktionen zusammengesetzten Gesamtkurve sowie deren globale Modellfreiheit.

Der vorgegebene Glättungsfaktor betrug hier 0,2.

erforderliche Umpipettieren entfällt, somit sind Materialverbrauch, Anfall radioaktiv verseuchten Abfalls und Zeitaufwand geringer.

Als einziger Nachteil wäre der recht hohe Preis des präzipitierenden Eserums zu nennen. Die effektiven Kosten können jedoch durch Auswahl geeigneter Arbeitsbedingungen mit hoher Verdünnung des zweiten Antikörpers niedrig gehalten werden.

Ein Ergebnis von großer Bedeutung stellt wohl die Verkürzung der Testdauer des RIA auf einen Arbeitstag dar, so daß als wesentlicher Zeitfaktor nur noch die Dialyse der Plasmaproben ins Gewicht fällt, welche einen weiteren Tag beansprucht. Im folgenden Abschnitt dieses Kapitels soll ein die Dialyse ersetzendes Verfahren zur Aufarbeitung der Plasmaproben vorgestellt werden, das auch für diesen Schritt einen sehr raschen Ablauf gewährleistet.

Ebenso erbrachte die automatische Auswertung der Testergebnisse mit Hilfe eines geeigneten Rechner-Programms beachtliche Einsparungen an Zeit und Mühe.

Abschnitt B

Ionenaustauscher-Verfahren

1. Prinzip

Die Aufbereitung der Plasmaproben für den RIA durch Dialyse ist zeitaufwendig, unhandlich und schließt zudem störende Einflüsse durch die dialysierbaren, FPA-enthaltenden Fibrinogen-Fragmente E und Y nicht sicher aus. Auf der Suche nach möglichen Alternativen erprobten wir zunächst die Molekularsieb-Säulenchromatographie mit Sephadex G-50, wurden jedoch enttäuscht durch das kaum überwindbare Problem, bei angestrebter Unkompliziertheit der Technik eine saubere, engvolumige Abtrennung des kleinmolekularen Peptids in einer reproduzierbaren Eluat-Fraktion zu erreichen. Auch im Falle eines Erfolges wäre der Arbeits- und Materialaufwand mit der Säulenchromatographie ganz erheblich gewesen.

Im weiteren Verlauf unserer Methodensuche wandten wir unsere Aufmerksamkeit nunmehr den besonderen Ladungseigenschaften von FPA zu. Bereits die Primärstruktur läßt das stark saure Verhalten des Moleküls erkennen (Blombäck et al. 1966):



Fünf Carboxyl-Gruppen (2 residuale Glutaminsäure-Carboxyle, 2 residuale Asparaginsäure-Carboxyle, 1 C-terminales Arginin-Carboxyl) stehen nur zwei basische Gruppen (1 N-terminales Alanin-Amin, 1 residuale Guanidino-Gruppe von Arginin) gegenüber. So verwundert es nicht, daß das Peptid in der Elektrophorese bei pH = 4,1 in Acetat-Puffer noch anionisch wandert, also einen isoelektrischen Punkt aufweist, der noch unter diesem pH liegt. Demgegenüber sind Fibrinogen und seine Plasmin-induzierten Spaltprodukte weit "neutralere" Moleküle.

Von diesen Überlegungen ausgehend haben wir ein Extraktionsverfahren für FPA aus Plasmaproben mittels Ionenaustauscher-Gel in der Aufschwemm-Technik aufgebaut und erprobt. Zur Verwendung kam handelsübliches Gel Sephadex DEAE-A-25 (Pharmacia, Uppsala), ein schwach basischer, anionischer Austauscher mit kleiner Porengröße. Bei geeigneter Wahl der Pufferbedingungen nach pH und Ionenstärke sollte dieser Austauscher in der Lage sein, FPA aus Plasmaproben unter Ausschluß weniger saurer, höhermolekularer Fibrinogen-Spaltprodukte spezifisch zu adsorbieren.

Der Ablauf des Ionenaustauscher-Verfahrens stellt sich in seinen Grundzügen wie folgt dar: Für jede Plasma-Probe wird ein Reagenz-Röhrchen mit einer bestimmten Menge Ionenaustauscher-Gel vorbereitet, welches in Acetat-Puffer bei genau eingestelltem pH im sauren Bereich äquilibriert ist. Nach Äthanol-Defibrinierung gelangt der Überstand einer Plasmaprobe in ein solches Gel-Röhrchen, wo er mit dem in Puffer aufgeschwemmten Ionenaustauscher inkubiert wird. Nach Abtrennung des Gels von der Lösung und ausreichender Spülung zur Beseitigung anhaftender Plasma-Reste kann gebundenes FPA durch Änderung von pH und Ionenstärke aus dem Gel freigesetzt und in den Ansätzen des RIA bestimmt werden.

2. Dimensionierung

Unsere Aufgabe bestand zunächst darin, geeignete Arbeitsbedingungen für die einzelnen Phasen des Trennverfahrens zu definieren und eine entsprechende Dimensionierung der einzusetzenden Gel-Menge, Pufferlösungen und Reagenzien zu erstellen.

Als Basis-Puffer wurde das Acetat-System mit einem pK_a von 4,75 verwendet, wenngleich dies einen Gegenionen-Wechsel am Austauscher-Gel, welches als Chlorid-Salz geliefert wird,

erforderlich machte. Für die Inkubationsphase legten wir eine Säurestärke von $\text{pH} = 4,7$ fest. Bei diesem Wert ist einerseits theoretisch eine vollständige Bindung des negativ geladenen FPA an das Gel gewährleistet, andererseits arbeitet der Acetat-Puffer im Bereich seiner größten Kapazität. Das Gesamtvolumen soll während der Inkubationsphase aus Gründen der pH-Stabilität groß sein; es wurde zu 10 ml festgesetzt, die sich aufteilen in 9 ml Acetat-Puffer ("Puffer A") und 1 ml defibriniertes Plasma (Probenvolumen). Der reine Plasma-Anteil am Probenvolumen beträgt folglich $500\ \mu\text{l}$, da aus der Defibrinierung ein Äthanol-Gehalt von 50 % zu berücksichtigen ist. Die Gel-Menge in einem Röhrchen ist so berechnet, daß die mit der Plasma-Probe in den Inkubationsansatz gelangenden Chlorid-Ionen, welche eine wesentlich höhere Affinität zum Austauscher haben als Acetat (und wohl auch FPA), nur etwa die Hälfte der zur Verfügung stehenden fixen Kationengruppen besetzen. Dadurch soll eine Überlastung der Austauscher-Kapazität vermieden werden, die eine mangelhafte Adsorption von FPA zur Folge hätte.

Die Eluationsphase wird eingeleitet durch Zugabe einer Salzsäure-NaCl-Lösung ("Lösung B"), welche so bemessen ist, daß das pH auf etwa 3,5 absinkt und gleichzeitig die Chlorid-Konzentration auf 0,5 M ansteigt. Bei der Dimensionierung dieser Lösung war zu berücksichtigen, daß durch die NaCl-Zugabe abermals Acetat-Ionen aus dem Gel freigesetzt werden, die durch entsprechende Säurestärke abgefangen werden müssen, um das pH nicht ungewollt anzuheben.

Schließlich mußte eine Puffer-Lösung ("Puffer B") bereitgestellt werden, mit welcher eine Korrektur des FPA-enthaltenen Eluats auf die Arbeitsbedingungen des RIA vorgenommen werden kann. Letztere wurden ebenfalls der veränderten Zusammensetzung der Eluat-Probe angeglichen und sind aus der Formel von Puffer C ersichtlich.

Austauscher-Gel, Lösungen und Reagenzien:

1. Sephadex-Gel DEAE A-25:

Zum Gegenionen-Austausch muß das Gel vor Verwendung wiederholt in 1 M Na-Acetat digeriert (Lösung A) und anschließend mit Puffer A äquilibriert werden. Ein Reagenz-Röhrchen erhält eine Suspension von 30 mg Gel (Trockengewicht) in 9 ml Puffer A.

2. Puffer A - Na-Acetat-Puffer pH 4,7:

Essigsäure 0,1 M,
eingestellt mit NaOH,
Chlorhexidin 0,02 g/l (Stabilisator).

3. Puffer B - Tris-HCl-Puffer pH 8,5:

Tris 0,067 M,
Ovalbumin 0,13 % frisch zugesetzt.

4. Puffer C - Tris-HCl-Puffer pH 7,5:

Tris 0,05 M,
NaCl 0,1 M,
Na-Acetat 0,02 M,
Merthiolat 0,2 g/l (Stabilisator),
Albumin 0,1 % frisch zugesetzt.

5. Lösung A:

Na-Acetat 1 M.

6. Lösung B:

HCl 0,1 M,
NaCl 0,4 M.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß auf völlige Abwesenheit von Chlorid im äquilibrierten Austauscher-Gel (Silbernitrats-Probe!) sowie auf genaue Einstellung von Puffer A besonders geachtet werden muß.

3. Bindungskinetik

Mit dem Ziel, die erforderliche Dauer der Inkubation der Plasma-Proben mit dem Austauscherelement sowie der Elution zu ermitteln, haben wir die Bindungskinetik von FPA an die Matrix des Gels untersucht. Der Einfachheit halber verwendeten wir hierzu radioaktiv markiertes Tracer-Peptid, welches gegenüber nativem FPA nur geringfügige Ladungsunterschiede aufweist.

In vorbereitete Gel-Röhrchen (30 mg Gel Trockengewicht suspendiert in 9,5 ml Puffer A) wurden jeweils 500 μ l endverdünnte Tracer-Lösung einpipettiert. Die Röhrchen wurden verschlossen inkubiert, wobei Homogenität der Gel-Suspension und intensive Durchmischung durch ein Rollen-Mischgerät gewährleistet wurde. Nach variablen Zeitintervallen wurde jeweils ein Röhrchen vom Rollenmischer genommen, entstopft und scharf anzentrifugiert. Vom Gel-freien Überstand wurden jeweils 0,5 ml in ein Eppendorf-Gefäß umpipettiert und szintimetrisch ausgezählt (Tracerlab, Fa. Gammaguard). Der progrediente Verlust an Aktivität im Gel-freien Überstand spiegelte die zunehmende Adsorption von markiertem Peptid an die Gel-Matrix wieder: Bereits nach 10 Minuten waren 85,4%, nach 20 Minuten 91,9 % und nach 30 Minuten 92,6 % der Gesamt-Aktivität gebunden. Der 30-Minuten-Wert repräsentierte bereits das Plateau, welches für die nachfolgenden 3 Stunden konstant blieb und einen Mittelwert von 92,7 %, Standard-Abweichung 0,33 %, aufwies. Dieser Plateauwert konnte nach Abschluß des Versuchs für alle Röhrchen durch Auszählung der Gel-Rückstände bestätigt werden (Mittelwert 93,1 %).

Nun wurden alle Gel-Rückstände in denselben Röhrchen wiederaufgeschwemmt, wobei abermals Puffer A verwendet wurde ("Waschen"). Nach 5 Minuten Inkubation auf dem Rollenmischer wurden alle Röhrchen scharf anzentrifugiert

und die Überstände wie zuvor ausgezählt. Dabei ergab sich ein Aktivitätsverlust des Gels von 2,6 % (Mittelwert), der wiederum durch Auszählung der Gel-Rückstände bestätigt werden konnte.

In Fortführung dieses Versuchs wurde nunmehr auf die nassen Gelrückstände jeweils 1 ml der Lösung B gegeben und somit die Eluationsphase eingeleitet. Wieder erfolgte eine Inkubation der Röhrchen auf dem Rollenmischer, die nach bestimmten Zeitintervallen durch Zentrifugation jeweils eines Röhrchens beendet wurde. Die im Überstand ermittelte, von freigesetztem Tracer-Peptid herrührende Aktivität war Ausdruck der Kinetik der Eluation: Nach 5 Minuten enthielt die Gel-freie Lösung bereits 96,2 % der gebundenen Aktivität, nach 10 Minuten war das Plateau mit einem Mittelwert von 99,2 %, Standard-Abweichung 2,51 %, erreicht.

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

1. Die Inkubation der FPA-Probe mit der Gel-Suspension kann nach 30 Minuten beendet werden. Zu diesem Zeitpunkt sind mehr als 90 % des Peptids an der Gel-Matrix adsorbiert.
2. Durch Waschung des Gels mit Puffer A gehen nur geringe Mengen an FPA aus dem Gel verloren.
3. Die Eluation kann nach 10 Minuten beendet werden. Gel-adsorbiertes FPA wird in diesem Zeitraum praktisch vollständig wieder freigesetzt.

Wie bereits erwähnt, muß vor dem Einsatz einer Eluat-Probe im Radioimmunoassay eine Korrektur der Puffer-Formel stattfinden. Hierzu werden 1 ml der Eluat-Probe mit 3 ml Puffer B versetzt. Die Zusammensetzung der Probe entspricht dann der

Formel des Puffers C, mit welchem auch Verdünnungsstufen dieser Probe hergestellt werden können.

4. Diskussion

Das hier beschriebene Verfahren zur Aufbereitung von Plasmaproben für den Radioimmunoassay von FPA bietet sich als vorteilhafte Alternative zur Dialyse-Technik an. Es wurde nachgewiesen, daß FPA durch den Ionenaustauscher Sephadex DEAE A-25 unter den angegebenen Arbeitsbedingungen nahezu vollständig aus Testproben extrahiert wird. Die Vorzüge der Gel-Adsorptionstechnik im Aufschwemm-Verfahren können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Rascher Ablauf:

Der Zeitaufwand für diesen Teilschritt in der Plasmaproben-Verarbeitung beträgt lediglich etwa 70 Minuten, während die Dialyse 18 Stunden in Anspruch nimmt.

2. Reproduzierbarer Wirkungsgrad:

FPA wird nahezu vollständig aus den Proben extrahiert. Wenngleich wir auch für das Dialyse-Verfahren einen Wirkungsgrad von praktisch 100 % ermitteln konnten, so finden sich hierüber in der Literatur doch unterschiedliche Angaben.

3. Spezifität:

Die Arbeitsbedingungen sind nach Gel-Typ und pH-Wert solchermaßen berechnet, daß Plasmin-induzierte Fibrinogen-Spaltprodukte von der Bindung an die Matrix des Austauschers aufgrund ihrer Ladungseigenschaften sowie ihrer Molekülgröße ausgeschlossen werden. Freilich wäre der empirische Nachweis hierfür noch zu erbringen. Demgegenüber kann die Dialyse-Technik keine volle Spezifität gewährleisten.

4. Einfache Handhabung:

Gel-Röhrchen können unabhängig vom eigentlichen Testablauf in großer Zahl vorbereitet und aufbewahrt werden. Während der Verarbeitung von Plasma-Proben fallen lediglich einfache Arbeitsgänge wie Pipettieren und Zentrifugieren an. Dagegen ist die Dialyse-Technik recht unhandlich und zeitaufwendig und erfordert einige Übung.

In der Tat haben die Herren Doktoranden Drost und Borlinghaus in meiner Nachfolge dieses Verfahren in den Testablauf des FPA-Nachweises in Plasma-Proben einführen können und seine Verwendbarkeit nachgewiesen. In Verbindung mit der Doppel-Antikörper-Methode mit ihren verkürzten Inkubationszeiten sowie der Rechner-gestützten Auswertung der Ergebnisse besteht nunmehr die Möglichkeit, den gesamten Testablauf von der Zentrifugation der Blutproben bis zum Erhalt der Testergebnisse innerhalb eines Arbeitstages durchzuführen, womit die klinische Relevanz der Bestimmung von FPA-Konzentrationen gerade bei akuten Störungen der Hämostase erheblich gesteigert wird.

IV. Kapitel

K l i n i s c h e E r g e b n i s s e

1. Vorbemerkungen

Das Hauptgewicht meiner Aufgabe lag in der Einführung und methodischen Verbesserung des Testverfahrens für Plasmakonzentrationen von Fibrinopeptid A. Eine klinische Anwendung in größerem Umfang wurde von meinen Nachfolgern, den Herren Doktoranden Drost und Borlinghaus durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind in den jeweiligen Dissertationschriften nachzulesen. Hier sollen lediglich einige klinische Erfahrungen berichtet werden, die wir im Rahmen der Erprobung der Doppel-Antikörper-Methode und der Rechner-gestützten Auswertung gewinnen konnten.

2. Normalwerte

Wir haben Bestimmungen des FPA-Spiegels im Blutplasma von 42 klinisch gesunden Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 20 bis 62 Jahren vorgenommen. Ausgeschlossen wurden Frauen in der Menstruation sowie unter antikonzeptioneller Medikation. Die Blutproben wurden bei Zimmertemperatur transportiert, maximal 1 Stunde nach Blutentnahme zentrifugiert und anschließend sofort tiefgefroren. Sie waren, wie in Kapitel II, Abschnitt A,4 beschrieben, zur Hemmung proteolytischer Aktivitäten mit Heparin und Trasylol versetzt. Wir fanden einen mittleren FPA-Spiegel von 1,51 ng/ml bei einer Standardabweichung von 0,69 ng/ml. Der höchste gemessene Wert betrug 2,6 ng/ml. Es konnte kein signifikanter Geschlechtsunterschied festgestellt werden.

Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit jenen von Gerrits und Mitarbeitern (1974), die bei 37 Normalpersonen einen mittleren Spiegel von 1,4 ng/ml mit einer Standardabweichung von 0,5 ng/ml feststellten. Dagegen berichten Nossel und Mitarbeiter (1974) einen Mittelwert von 0,5 ng/ml bei 30 klinisch gesunden Probanden und Kockum (1976) einen Medianwert von kleiner als 0,5 ng/ml bei einem Maximalwert von 1,7 ng/ml. Zur Erklärung dieser Diskrepanz bieten sich drei Hypothesen an:

1. Unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antiseren:

Bei dem von Gerrits und Mitarbeitern (1974) und von uns selbst benützten Antiserum könnte es sich um ein solches mit niedriger Spezifität gehandelt haben, das mit dialysierbaren, Plasmin-induzierten Spaltprodukten von Fibrinogen kreuzreagierte.

2. Fehlerhafter FPA-Standard:

Der aus dem Reagenziensatz der Fa. IMCO stammende FPA-Standard ist möglicherweise fehlerhaft eingestellt und verursacht dadurch einen systematischen Fehler für alle FPA-Bestimmungen.

3. Behandlung der Blutproben:

Es ist zu erwägen, daß der FPA-Spiegel in den Blutproben während ihres Transports bei Zimmertemperatur trotz Zusatz von Heparin und Trasylol möglicherweise ansteigt. Zur Klärung dieser Frage haben wir Heparin-Trasylol-Plasma einiger Probanden bei Zimmertemperatur mehrere Stunden lang stehen gelassen. Die in gewissen Zeitabständen ermittelten FPA-Spiegel blieben über mindestens zwei Stunden konstant, um nach 4 Stunden uncharakteristisch nach oben oder unten abzuweichen.

Die interessante Fragestellung, inwieweit eine altersmäßige Abhängigkeit des Normalbereichs für FPA-Spiegel besteht,

wäre an einem größeren Kollektiv zu überprüfen. Voraussetzung für eine solche Untersuchung wäre über den klinischen Normalbefund hinaus natürlich der sichere Ausschluß einer schleichenden Phlebothrombose, die mit höherem Alter einen zunehmend häufigen "Normalbefund" darstellt.

3. FPA-Spiegel bei verschiedenen Erkrankungen

Die Bestimmung von FPA-Plasmaspiegeln kann möglicherweise zur Früherkennung und Verlaufskontrolle der Verbrauchs-koagulopathie ("DIC-Syndrom") einen wichtigen Beitrag leisten. Wir haben bei 19 Patienten mit klinisch oder kulturell gesicherter Sepsis zum Teil enorme Anstiege der FPA-Spiegel beobachten können. Bei positiver Blutkultur konnten als Krankheitserreger entweder E. coli oder Klebsiellen isoliert werden. Die FPA-Plasmaspiegel stiegen während der akuten, mit Schock-Symptomatik gekennzeichneten Phase auf Höchstwerte zwischen 15 ng/ml und 650 ng/ml. Als Mittelwert dieser gemessenen Höchstwerte ergab sich ein Spiegel von 102 ng/ml. Gerade für die Diagnose der schleichend beginnenden, kulturell noch nicht gesicherten, bakteriellen Sepsis könnte die Beobachtung des Verlaufs des FPA-Plasmaspiegels wertvolle Hinweise liefern.

Deutlich erhöhte FPA-Spiegel im Bereich bis zu 30 ng/ml fanden wir bei Patienten mit tiefer Bein- und Beckenvenenthrombose. Den höchsten Wert von 55 ng/ml wies eine 62-jährige Patientin auf, deren Phlebothrombose auf eine akute Myeloblasten-Leukämie zurückzuführen war.

Bei einem männlichen Patienten mit hypernephroidem Karzinom wurde eine Embolisation des Gefäß-Hauptstamms des Nierentumors mittels selektiver Kathetertechnik durchgeführt. Der FPA-Spiegel betrug vor dem Eingriff 9,5 ng/ml und stieg unmittelbar danach auf 46 ng/ml, um bis zum nächsten

Morgen auf 18 ng/ml abzufallen. Am zweiten Tag nach der Embolisation erreichte der FPA-Spiegel wieder ein konstantes Niveau von 9,5 ng/ml.

Die Substitution eines Hemmkörper-Hämophilen (Faktor-VIII-Inhibitor-Titer über 50 E/ml) mit FEIBA-Prokoagulationsfaktoren (FEIBA = Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity, Präparat der Fa. Immuno, Heidelberg) resultierte innerhalb 1 Stunde in einem Anstieg des FPA-Spiegels von 5,0 auf 16 ng/ml, dem ein erneuter Abfall am nächsten Tag auf 5,0 ng folgte. Klinisch kam es gleichzeitig zum Sistieren einer mehrere Tage anhaltenden Nachblutung nach Zahnextraktion.

Einen interessanten Befund stellte die Abwesenheit eines signifikanten Anstiegs des FPA-Spiegels bei einem Patienten mit arterieller Retinathrombose dar. Hierbei wurde 4 Stunden nach dem akuten Ereignis ein Spiegel von 2,2 ng/ml gemessen.

4. Diskussion

Die bisher vorliegenden Ergebnisse lassen die Bestimmung der Plasmakonzentration von Fibrinopeptid A als einen Parameter von großem klinischem Interesse erscheinen. Bei den verschiedenen mit Hyperkoagulabilität einhergehenden Erkrankungen ist der FPA-Spiegel als Ausdruck der gesteigerten Thrombin-Aktivität in jeweils charakteristischer Weise erhöht.

In dieser Hinsicht bedeutete die Entwicklung des hochempfindlichen Radioimmunoassays von FPA durch Nossel und Mitarbeiter (1971) eine Bereicherung der hämostaseologischen Forschung. Die Verwendbarkeit des Tests in klinischen Akutsituationen hängt entscheidend von seiner Spezifität sowie von der raschen Verfügbarkeit der Ergebnisse ab. In dem Bestreben, der Erfüllung beider Voraussetzungen

näherzukommen, haben wir verschiedene Modifikationen an der Originalmethode vorgenommen. Dabei konnte die Gesamt-Dauer des Testablaufs von ursprünglich drei Tagen auf einen Arbeitstag verkürzt werden. Es wäre wünschenswert, in weiteren methodischen Untersuchungen zu belegen, inwieweit sich auch die Spezifität des Verfahrens durch die Einführung der Ionenaustauscher-Adsorptionstechnik zur Aufbereitung der Plasma-Proben verbessert hat.

Möglicherweise wird der Radioimmunoassay von Fibrinopeptid A schon bald zur Standard-Ausstattung im Angebot eines größeren hämostaseologischen Routinelabors zählen. Es bleibt zu hoffen, daß bis dahin die methodischen Schwierigkeiten vollends überwunden und die pathophysiologischen Zusammenhänge soweit geklärt sein werden, daß ein sinnvoller Einsatz dieses hochempfindlichen Tests gewährleistet ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Bestimmung der Plasmakonzentration von Fibrinopeptid A (FPA) stellt einen spezifischen Parameter für die aktuelle Thrombin-Aktivität dar. Nossel und Mitarbeiter haben hierfür im Jahre 1971 einen hochempfindlichen Radioimmunoassay entwickelt. Hier werden eigene Erfahrungen bei der Einführung dieses Tests sowie eine Reihe von methodischen Verbesserungen mitgeteilt, welche eine Verkürzung des gesamten Testablaufs auf einen Arbeitstag sowie eine unkomplizierte Handhabung ermöglichten. Dabei handelt es sich um ein Gel-Adsorptionsverfahren zur Extraktion von FPA aus defibrierten Plasma-Proben, die Doppel-Antikörper-Methode zur Trennung der freien und Antikörper-gebundenen Tracer-Phase im Assay sowie die automatisierte Auswertung der Test-Ergebnisse mit Hilfe eines geeigneten Rechner-Programms. Bei allen vorgenommenen methodischen Veränderungen spielten Überlegungen zur Spezifität der Testaussage, insbesondere die Notwendigkeit, störende Plasmin-induzierte Fibrinogen-Spaltprodukte vom Assay fernzuhalten, eine entscheidende Rolle.

Der Versuch einer Definition des Normalbereichs für FPA-Plasmaspiegel wurde vorgenommen und ergab bei 42 klinisch gesunden Probanden einen Mittelwert von 1,51 ng/ml bei einer Standardabweichung von 0,69 ng/ml. Pathologisch erhöhte FPA-Spiegel fanden sich regelmäßig bei Patienten mit septischen und thrombotischen Erkrankungen.

L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

1. ABILDGAARD, U. (1965): "N-terminal analysis during coagulation of purified human fibrinogen, fraction I, and plasma". Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, 529.
2. ASBECK, F., E. LECHLER, et al. (1974): "Derivatives of fibrinogen and fibrin during Defibrase therapy: Separation of high and low molecular weight derivatives of fibrinogen and fibrin by agarose gel filtration". Hemostasis 3, 340.
3. BANDO, M., A. MATSUSHIMA, et al. (1972): "Thrombin-catalyzed conversion of fibrinogen to fibrin". J. Biochem. 71, 897.
4. BAYLEY, T., J. A. CLEMENTS, A. J. OSBAHR (1967): "Pulmonary and circulatory effects of fibrinopeptides". Cir. Res. 21, 469.
5. BETTELHEIM, F. R., K. BAILEY (1952): "The products of the action of thrombin on fibrinogen". Biochim. Biophys. Acta 9, 578.
6. BETTELHEIM, F. R. (1956): "The clotting of fibrinogen. II. Fractionation of peptide material liberated". Biochim. Biophys. Acta 19, 121.
7. BILEZIKIAN, S. B., H. L. NOSSEL, et al. (1975): "Radioimmunoassay of human fibrinopeptide B and kinetics of fibrinopeptide cleavage by different enzymes". J. Clin. Invest. 56, 438.
8. BILEZIKIAN, S. B., H. L. NOSSEL (1977): "Unique pattern of fibrinogen cleavage by human leukocyte proteases". Blood 50, 21.
9. BLOMBÄCK, B. (1958): "Studies of the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis". Ark Kemi 12, 321.
10. BLOMBÄCK, B., A. VESTERMARK (1958): "Isolation of fibrinopeptides by chromatography". Ark. Kemi 12, 173.
11. BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, et al. (1966): "Human fibrinopeptides: Isolation, characterisation and structure". Biochim. Biophys. Acta 115, 371.
12. BLOMBÄCK, B. (1967): "Fibrinogen to fibrin transformation", in W. H. SEEGER (ed.): Blood Clotting Enzymology. Academic Press, New York, pp. 143 - 215.

13. BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, P. OLSSON (1969): "Synthetic peptides with anticoagulant and vasodilating activity". Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl. 107, 59.
14. BLOMBÄCK, B., D. H. HOGG, et al. (1976): "Fibrinogen and fibrin formation". Thromb. Res. 8 (Suppl. 2), 329.
15. BORLINGHAUS, P. (in Druck): Dissertationsschrift.
16. BREEN, F. A., J. L. TULLIS (1968): "Ethanol gelation: A rapid screening test for intravascular coagulation". Ann. Intern. Med. 69, 1197.
17. BREEN, F. A., J. L. TULLIS (1969): "Ethanol gelation test improved". Ann. Intern. Med. 71, 433.
18. BUDZYNSKI, A. Z., V. J. MARDER (1975): "Determination of human fibrinopeptide A by radioimmunoassay in purified systems and in the blood". Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 709.
19. CANFIELD, R. E., J. DEAN, et al. (1976): "Reactivity of fibrinogen and fibrinopeptide A-containing fibrinogen fragments with antisera to fibrinopeptide A". Biochemistry 15, 1203.
20. COLMAN, R. W., A. J. OSBAHR, R. E. MORRIS (1967): "New vasoconstrictor, bovine peptide-B released during blood clotting". Nature 214, 1040.
21. DELEZENNE, C. (1896): "Formation d'une substance anticoagulante par circulation artificielle de peptone à travers la foie". Arch. de Physiol. 28, 655.
22. DROST, W. (in Druck): Dissertationsschrift.
23. EGBRING, R., W. SCHMIDT, et al. (1977): "Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects". Blood 49, 219.
24. ERHARDT, F. W., et al. (1973): "Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung". Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 381.
25. ERHARDT, F. W., P. C. SCRIBA (1974): "Probleme der radioimmunologischen h-TSH-Bestimmung". Ärztl. Lab. 20, 191.
26. EWART, M. R., M. W. C. HATTON, et al. (1970): "The proteolytic action of Arvin on human fibrinogen". Biochem. J. 118, 603.

27. FLETCHER, A. P., N. K. ALKJAERSIG, et al. (1970): "Blood hypercoagulability and thrombosis". Trans. Assoc. Am. Physicians 83, 159.
28. GERRITS, W. B. J., O. T. N. FLIER, J. VAN DER MEER (1974): "Fibrinopeptide A immunoreactivity in human plasma". Thromb. Res. 5, 197.
29. GODAL, H. C., U. ABILDGAARD (1966): "Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol". Scand. J. Haematol. 3, 342.
30. GOODFRIEND, T. L., L. LEVINE, G. D. FASMAN (1964): "Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology". Science 144, 1344.
31. GOODFRIEND, T. L., D. L. BALL (1969): "Radioimmunoassay of bradykinin: chemical modification to enable use of radioactive iodine". J. Lab. Clin. Med. 73, 501.
32. GRAEFF, H., et al. (1972): "Identification of fibrinogen derivatives in plasma samples". Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 610.
33. HERZIG, R. H., O. D. RATNOFF, J. R. SHAINOFF (1970): "Studies of a procoagulant fraction of southern copperhead venom: the preferential release of fibrinopeptide B". J. Lab. Clin. Med. 76, 451.
34. HOFMANN, V., P. W. STRAUB (1977): "A radioimmunoassay technique for the rapid measurement of human fibrinopeptide A". Thromb. Res. 11, 171.
35. HOGG, D. H., B. BLOMBÄCK (1974): "The specificity of the fibrinogen-thrombin reaction". Thromb. Res. 5, 685.
36. HOWELL, W. H., E. HOLT (1918): "Two new factors in blood coagulation: heparin and pro-antithrombin". Amer. J. Physiol. 47, 328.
37. HUNTER, W. M., F. C. GREENWOOD (1962): "Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity". Nature 194, 495.
38. ITTYERAH, T. R., K. S. DODGSON, C. G. CURTIS (1972): "Plasma fibrinogen concentration after intravenous administration of fibrinopeptides to rats". Biochem. J. 128, 733.
39. JORPES, J. E. (1971): "Heparin", in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXVII. Springer, Berlin, pp. 143 - 146.

40. KAKKAR, V. V., T. P. CORRIGAN, et al.: "Efficacy of low doses of heparin in prevention of deep vein thrombosis after major surgery. A double-blind randomized trial". *Lancet* 2, 101.
41. von KAULLA, K. N., E. von KAULLA (1969): "Subkutanes Heparin zur Bekämpfung der Hyperkoagulabilität". *Dt. med. Wschr.* 94, 985.
42. KAY, A. B., D. S. PEPPER, R. MCKENZIE (1974): "The identification of fibrinopeptide B as a chemotactic agent derived from human fibrinogen". *Br. J. Haematol.* 27, 669.
43. KIDDER, W. R., L. J. LOGAN, et al. (1972): "The plasma protamin coagulation test: Clinical and laboratory evaluation". *Am. J. Clin. Pathol.* 58, 675.
44. KOCKUM, C. (1976): "Radioimmunoassay of fibrinopeptide A. Clinical applications". *Thrombosis Res.* 8, 225.
45. KROPATKIN, M. L., G. IZAK (1968): "Studies on the hypercoagulable state. The regulation of fibrinogen production in experimental hyper- and hypofibrinogenemia". *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19, 547.
46. LATALLO, Z. S., L. E. MATTLER, et al. (1976): "Analysis of soluble fibrin complexes by agarose gel chromatography and protamine sulfate gelation". *Biochim. Biophys. Acta* 420, 69.
47. LIPINSKI, B., K. WOROWSKI (1968): "Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulfate test". *Thromb. Diath. Haemorrh.* 20, 44.
48. LORAND, L. (1951): "'Fibrino-Peptide': new aspects of the fibrinogen-fibrin transformation". *Nature* 167, 992.
49. MARSCHNER, I., et al. (1974): "Radioimmunoassay and related procedures in medicine", Vol. I. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna.
50. MARX, R. (1958): "Thrombose". *Dt. med. Wschr.* 83, 2062.
51. MATTHIAS, F. R., D. L. HEENE, E. KONRADI (1973): "Behavior of fibrinogen and fibrinogen degradation products (FDP) towards insolubilized fibrinogen and fibrin monomer". *Thromb. Res.* 3, 657.
52. MATTHIAS, F. R., R. REINICKE, D. L. HEENE (1977): "Affinity chromatography and quantification of soluble fibrin from plasma". *Thromb. Res.* 10, 365.

53. MCKEE, P. A., L. A. ROGERS, et al. (1966): "The subunit polypeptides of human fibrinogen". Arch. Biochem. 116, 271.
54. MERRIFIELD, R. B. (1969): "Solid-phase peptide synthesis". Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 32, 221.
55. MORGAN, C. R., A. LAZAROW (1962): "Immunoassay of insulin using a two-antibody-system". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 29.
56. MURRAY, D. W. G., L. B. JAUQUES, et al. (1936): "Heparin and vascular occlusion". Canad. Med. Assoc. J. 35, 621.
57. NIEWIAROWSKI, S., V. GUREWICH (1971): "Laboratory identification of intravascular coagulation. The serial dilution protamine sulfate test for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products". J. Lab. Clin. Med. 77, 665.
58. NOSSEL, H. L., L. R. YOUNGER, et al. (1971): Radio-immunoassay of human fibrinopeptide A". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2350.
59. NOSSEL, H. L., I. YUDELMAN, et al. (1974): "Measurement of fibrinopeptide A in human blood". J. Clin. Invest. 54, 43.
60. NOSSEL, H. L. (1976): "Radioimmunoassay of fibrinopeptides in reaction to intravascular coagulation and thrombosis". N. Engl. J. Med. 295, 428.
61. NOSSEL, H. L., M. TI, et al. (1976 a): "The generation of fibrinopeptide A in clinical blood samples. Evidence for thrombin activity". J. Clin. Invest. 58, 1136.
62. NOSSEL, H. L., V. P. BUTLER, et al. (1976 b): "Specificity of antisera to human fibrinopeptide A used in clinical fibrinopeptide A assays". Thromb. Haemostasis 35, 101.
63. OSBAHR, A. J., J. A. GLADNER, K. LAKI (1964): "Studies on the physiological activity of the peptide released during fibrinogen-fibrin conversion". Biochim. Biophys. Acta 86, 535.
64. OSBAHR, A. J. (1975): "Structure-activity relationships of the vasopressor activity of canine peptide A from fibrinogen". Biochim. Biophys. Acta 386, 373.
65. OSBAHR, A. J., R. CUSTODIO (1975): "Action of peptide-B-fibrinogen on ATPase activity and super-precipitation of myosin B". Am. J. Physiol. 228, 488.

66. PALESTER-CHLEBOWCZYK, M., E. STRZYZEWSKA, et al. (1971): "Preliminary results of the protamine sulfate test in plasma of various patients". Scand. J. Haematol. (Suppl.) 13, 183.
67. PIZZO, S. V., M. L. SCHWARTZ, et al. (1972): "The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen". J. Biol. Chem. 247, 636.
68. PLOW, E. F., T. S. EDGINGTON (1975): "An alternative pathway for fibrinolysis. 1. The cleavage of fibrinogen by leukocyte proteases at physiologic pH". J. Clin. Invest. 56, 30.
69. QURESHI, G. D., H. L. NOSSEL (1972): "Stability studies of human fibrinopeptide A as measured by radioimmunoassay". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1069.
70. SASAKI, T., I. H. PAGE, J. R. SHAINOFF (1966): "Stable complex of fibrinogen and fibrin". Science 152, 1069.
71. SCHMIDT-MÜLHEIM, A. (1880): "Beiträge zur Kenntniss des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung". Du Bois-Reymond Arch. Physiol. 4, 33.
72. SCHRAMM, W., M. SCHMID, F. W. ERHARDT (1977): "Radio-immunoassay von Fibrinopeptid A: Doppel-Antikörper-Methode". Fortschr. Med. 95, 1291.
73. SHAINOFF, J. R., I. H. PAGE (1960): "Co-fibrins and fibrin-intermediates as indicators of thrombin activity in vivo". Circ. Res. 8, 1013.
74. SHAINOFF, J. R., I. H. PAGE (1962): "Significance of cryo-fibrin in fibrinogen-fibrin conversion". J. Exp. Med. 116, 687.
75. SMITH, G. F., N. U. BANG (1972): "Formation of soluble fibrin polymers. Fibrinogen degradation fragments D and E fail to form soluble complexes with fibrin monomer". Biochemistry 11, 2958.
76. SVENDSEN, L., B. BLOMBÄCK, et al. (1972): "Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin, and thrombin-like enzymes". Thromb. Res. 1, 267.
77. TEGER-NILSSON, A. C., N. J. GRONDÄHL (1974): "A search for fibrinopeptides in urine during experimental intravascular coagulation in dogs". Thromb. Res. 4, 131.
78. WALLEN, P. (1971): "Plasmic degradation of fibrinogen". Scand. J. Haematol. (Suppl.) 13, 3.

79. WILNER, G. D., H. L. NOSSEL, et al. (1976):
"Immunochemical studies of human fibrinopeptide A
using synthetic peptide homologues". Biochemistry 15, 1209.
80. YUDELMAN, I., K. SPANONDIS, H. L. NOSSEL (1974):
"Comparative behavior of 125-J-fibrinogen and 125-J-fibrin
in solution". Thromb. Res. 5, 495.

L e b e n s l a u f

Ich, Michael Schmid, wurde am 9. Oktober 1952 als Sohn eines Bankkaufmanns in Bogen, Niederbayern, geboren. Mein Vater stammt aus dem Landkreis Bogen, meine Mutter, geb. Nikitin, aus der Ukraine. In München besuchte ich die Volksschule und das Oskar-von-Miller-Gymnasium, wo ich im Jahre 1972 das Abitur erhielt. In den Jahren 1972 bis 1980 studierte ich Medizin an den Universitäten München und Glasgow. Nach bestandener Ärztlicher Prüfung erhielt ich am 14. Mai 1980 die Approbation als Arzt. Seit Juli 1980 bin ich im Reinhard-Nieter-Krankenhaus, Wilhelmshaven, als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Frerichs tätig. Ich strebe die Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin an.

München, im Mai 1981.

